



Tesis Doctoral:
Identificación de una firma
inmunohistoquímica con valor
predictivo en el carcinoma
infiltrante de mama de tipo no
especial (NST)

Laura Macías García
DNI 48821350D
laura.macias.garcia@gmail.com

Departamento: Fisiología Médica y Biofísica
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Biomedicina

Sevilla, 2015



Departamento: Fisiología Médica y Biofísica

Programa de Doctorado: Biología Molecular y Biomedicina

Directores

Dr. Ricardo González Cámpora

Dr. Antonio Robles Frías

Tutor

Dr. Rafael Fernández Chacón

Sevilla, 2015

Quiero dar las gracias al Dr. Ricardo González Cámpora, Dr. Antonio Robles Frías y al Dr. Rafael Fernández Chacón, directores y tutor de este proyecto, por su increíble amabilidad, su inestimable ayuda, su tiempo y su confianza.

Dedico esta Tesis,

A todo el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Valme de Sevilla, por hacerme sentir siempre como en casa.

Muy especialmente hago referencia al Dr. Rafael Martínez, Dr. Antonio Robles, Dra. María Jesús Pareja, Dr. Juan Miralles, Dr. José María Conde y Dr. Juan López; fantásticos maestros y mejores compañeros. Así como a Lucía Molina, amiga y compañera de especialidad, y sin olvidar a Almudena González, TEAP del Servicio.

Y de manera muy especial,

A mis padres, por transmitirme valores como la constancia, la superación y el amor incondicional.

A mi hermano Daniel, por enseñarme lo que es sentirse orgullosa y regalarme siempre gratis su alegría; y a Sara, que lo hace tan feliz.

A Diego y María, por vuestro increíble cariño todos estos años y permitirme formar parte de vuestras vidas.

A Jorge, mi compañero, mi mejor amigo,....mi constante.

ÍNDICE:

1.Introducción	7
1.1.E-Cadherina	9
1.2.Twist	15
1.3.ABCG2	20
1.4.Caveolina	25
1.5.CD10	31
1.6.CD44	35
1.7.CD117	39
1.8.CDK2	43
1.9.Citoqueratina 5/6	47
1.10.CXCR4	52
1.11.Fascina	58
1.12.FOXA1	63
1.13.HER2	70
1.14.Ki 67	76
1.15.p53	79
1.16.Receptor de Estrógenos	83
1.17.Receptor de Progesterona	88
1.18.RKIP	91
1.19.Survivina	95
1.20.TOPO-2alfa	100
1.21.Perfiles Moleculares	104
1.22.Matrices Tisulares	110
2.Objetivos	114
3.Material y Métodos	116
3.1. Selección de casos	117
3.2. Tejido	118
3.3 Construcción de los TMAs	118
3.4. Inmunohistoquímica	121
3.5. Análisis estadístico	133

4.Resultados	134
4.1 Características generales de la muestra:	135
4.2. Resultados Inmunohistoquímicos:	156
4.3 Estudios Estadísticos Univariantes:	207
4.4. Estudio estadístico multivariante:	210
5. Discusión	211
5.1. Estudio Univariante con relación significativa	212
5.2 Estudio Univariante moléculas No representativas	220
5.3 Estudio Multivariante	224
6. Conclusiones	227
7. Bibliografía	228

“

“Comienza el juego”

Sherlock Holmes

1.Introducción

En la actualidad, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en la mujer (1), siendo la causa principal de muerte en mujeres entre los 35 y 55 años en todo el mundo. Se estima que una de cada 9 mujeres sufrirá cáncer de mama durante su vida y que 130.000 mujeres mueren de cáncer de mama cada año (1,2).

La principal causa de estas muertes no es el tumor primario en sí mismo sino las metástasis a distancia (1). El hueso es el órgano más frecuentemente afectado (3,4), de tal modo que el 65 -75 % de los pacientes presentan afectación en estado avanzado (3), provocando dolor, fracturas patológicas y compresión de la médula espinal; lo que produce una importante reducción de la calidad de la vida del paciente (5). El patrón de afectación metastásica y difusión es distinto para cada órgano, y el establecimiento y el crecimiento de la metástasis dependerá de las interacciones entre el tumor, las células y el microambiente (5). La metastatización de los diferentes tumores depende de las propiedades intrínsecas del tumor primario y de las características específicas del órgano diana.

Así pues, el cáncer de mama metastásico es una compleja y no aleatoria (6) secuencia de múltiples pasos que requiere la expresión de genes específicos y receptores que actúan en conjunto (7,8). Aunque varias moléculas están implicadas en la metástasis del cáncer de mama, el mecanismo preciso de migración de las células tumorales a órganos específicos aún no se ha establecido definitivamente (4,9,10).

La elevada morbilidad asociada al cáncer de mama metastásico plantea como necesaria la identificación de biomarcadores predictivos de recaída que permitan clasificar a los pacientes en base a un alto o bajo riesgo de metástasis (7,10,11,12), con el fin de poder modular y dirigir la terapia (5).

Nuestro estudio pretende valorar la expresión de diversas moléculas mediante métodos inmunohistoquímicos, en matrices tisulares (MT) procedentes de 234 pacientes diagnosticados de carcinoma infiltrante de mama de tipo no específico, con el fin de identificar un perfil de biomarcadores con valor predictivo.

1.1.E-Cadherina

En la mayoría de los organismos pluricelulares, las células se organizan en conjuntos cooperativos denominados tejidos, que a su vez se reúnen dando lugar a unidades funcionales conocidas como órganos. Para ello, es necesario que las células se relacionen entre sí, mediante diferentes adhesiones intercelulares, y con la matriz extracelular.

Funcionalmente, las uniones celulares pueden clasificarse en tres grupos: uniones de oclusión, uniones de anclaje y uniones de comunicación (13-16).

Uniones de oclusión, estancas ó estrechas: Sellado entre las dos superficies celulares que interaccionan, impidiendo por tanto el paso de pequeñas moléculas.

Uniones de anclaje: Conectan los elementos citoesqueléticos de una célula a los de sus vecinas y a la matriz extracelular permitiendo que determinados grupos celulares se constituyan como unidades estructurales resistentes (músculo cardíaco ó la epidermis). Estructuralmente y funcionalmente, se dividen en dos grupos: las *uniones adherentes* y el grupo constituido por *desmosomas* y *hemidesmosomas*. Las primeras conectan entre sí filamentos de actina mediante cadherinas, mientras que las del segundo grupo, lo hace con filamentos intermedios empleando como moléculas de adhesión a la familia de las cadherinas o de las integrinas, según hablemos de desmosomas o hemidesmosomas respectivamente.

Uniones de tipo gap ó de hendidura. Conexión directa entre los citoplasmas de las células adyacentes que proporcionan canales abiertos que permite el paso de iones y moléculas pequeñas impidiendo el paso de proteínas y ácidos nucleicos.

Dentro de las uniones de anclaje célula-célula de tipo adherentes, tienen especial importancia las cadherinas.

Las ***cadherinas*** constituyen una familia de glucoproteínas que median la adherencia intercelular de forma dependiente de calcio (17). Se designan específicamente según el tipo de célula en el que se presentan. Las tres primeras cadherinas que se descubrieron se denominaron teniendo en cuenta el tejido en el que se encontraron (18): la cadherina E se halla en muchos tipos de células epiteliales, la cadherina N en células nerviosas, musculares y del cristalino, y la cadherina P en las células placentarias y epidérmicas (19).

Todas ellas pueden detectarse transitoriamente en otros tejidos durante su desarrollo embrionario. Además, continuamente se descubren nuevos tipos de cadherinas. En la actualidad, se postula que todas las células de los vertebrados expresan una o más cadherinas, cada una de las cuales está codificada por un gen distinto, siendo la expresión de cada tipo concreto una característica del tipo celular.

Actualmente, más de 30 moléculas diferentes se incluyen en el grupo de las cadherinas, algunas de ellas de función desconocida.

Comparando la secuencia de aminoácidos y su estructura, se han subdividido en cinco grupos: cadherinas clásicas tipos I y II, cadherinas desmosomales, protocadherinas y un último grupo de moléculas más distantes, relacionadas con las cadherinas. E-, P- y N-cadherinas, junto con la R-cadherina (cadherina4). Las cadherinas clásicas de tipo II (como las cadherinas-5 a -12), comparten la estructura básica de las cadherinas, pero tienen una escasa homología global de aminoácidos con las del tipo I.

Estructuralmente, la mayor parte son glucoproteínas con un dominio extracelular relativamente grande, de aproximadamente 550 residuos, un segmento único transmembrana de 700-750 residuos de aminoácido y un dominio citoplásmico único de aproximadamente 150 residuos. Todos ellos se sintetizan a partir de un precursor que incluye una secuencia señal y un propéptido de aproximadamente 155 residuos que sufre modificaciones posteriores (glicosilación, fosforilación y clivaje proteolítico), para dar lugar a la proteína madura (20).

La voluminosa fracción extracelular de la cadena polipeptídica está normalmente plegada en cinco dominios (los dominios EC1-EC5), cada uno de los cuales contiene alrededor de 110 residuos de aminoácidos (21). Cuatro de ellos son homólogos entre sí y probablemente contienen lugares de unión al calcio. En ausencia de éste, se produce en las cadherinas un importante cambio conformacional, siendo rápidamente degradadas por enzimas proteolíticas.

La mayor parte de las cadherinas actúan como proteínas de unión transmembrana mediando las interacciones entre los filamentos de actina del citoesqueleto de las células que se unen. Un dominio citoplásmico de estas cadherinas interactúa con el córtex de actina por medio de tres proteínas de unión intracelular denominadas cateninas.

Las uniones mediadas por las cadherinas son las responsables de mantener unión entre células, dar origen a colectivos celulares en tejidos individuales y mantener la integridad del tejido. Pueden ser el factor aislado más importante para mantener a las células unidas en tejidos firmemente cohesivos, ya que se ha demostrado que la inactivación de otros sistemas de unión tiene poco efecto si las cadherinas siguen funcionando (19).

El proceso de crecimiento invasivo es una característica tanto de los tejidos normales como de los neoplásicos. En el proceso de crecimiento normal, la célula localizada dentro de una colonia celular debe romper las uniones intercelulares mediadas por cadherinas y adquirir un fenotipo fibroblastoide con capacidad de motilidad, originando una neoplasia infiltrante.

La diseminación tumoral está regulada por mecanismos moleculares que controlan el paso de célula tumoral primaria a una célula con comportamiento invasivo. Este proceso, es conocido como Transición Epitelio-mesenquimal (EMT), y lleva consigo cambios histológicos específicos, tales como pérdida de polaridad y de contacto con las células adyacentes, con el fin de conferir capacidad de motilidad y desplazamiento del foco primario (22,23).

Así pues, la EMT es el proceso en el que una neoplasia progresa de tumor primario a invasivo y consta de los siguientes pasos: invasión, en la que las células tumorales atraviesan la lámina basal y penetran en el corion; intravasación, entrada en la circulación sistémica; extravasación, movimiento desde la circulación a un nuevo destino; supervivencia en ese nuevo destino y proliferación para constituir el tumor secundario (23).

Uno de los indicadores más comunes y fieles del inicio de EMT es la pérdida de la E-cadherina; proteína de unión célula-célula que permite adherencia entre sus membranas plasmáticas, y cuya pérdida se ha relacionado con la adquisición del fenotipo mesenquimal (24), con resultado positivo para marcadores inmunohistoquímicos estromales como vimentina y fibronectina. Por lo tanto, la pérdida de la e-cadherina aumenta la invasividad de las células tumorales, contribuyendo al inicio de la transición de adenoma en carcinoma invasivo; por lo que el nivel de e-cadherina se puede relacionar inversamente con el grado de diferenciación y el estadio tumoral (25).

Debido a la importancia de este hecho, son varios los estudios que han centrado su atención en la identificación de los reguladores genéticos y factores de transcripción que regulan la expresión de la e-cadherina (23).

Destacamos dos cadherinas, relacionadas con la EMT, la E-cadherina (epitelial) y la N-cadherina, ésta última, restringida en adultos al tejido neural, retina, células endoteliales, fibroblastos y miocitos (24). Se ha observado que los cambios moleculares y fenotípicos característicos de la invasión tumoral son equivalentes a los que se suceden en la fase de desarrollo embrionario durante la gastrulación y desarrollo de las crestas neurales (23). Una vez constituido el embrión, el EMT es frenado quedando los factores de transcripción reguladores, así como las proteínas codificadas por éstos, inactivos en estado de latencia. Ante situaciones de anormalidad en la edad adulta, como inflamaciones, aberraciones, daños de ADN, estrés celular y activación de proto-oncogenes, este proceso y sus factores de transcripción son reactivados, promoviendo la EMT y dando lugar a desplazamientos de células y, en caso de neoplasias, a la aparición de metástasis (22).

Debido a que para el mantenimiento de la normal adhesividad intercelular se requiere un complejo cadherina-catenina intacto, diversos grupos de investigación han propuesto que la E-cadherina desarrolla un papel de molécula inhibidora de la invasión en los carcinomas.

Existen múltiples estudios inmunohistoquímicos que apoyan esta teoría, de forma que se ha demostrado que carcinomas de distintos órganos expresan niveles aberrantes de E-cadherina en comparación con los tejidos normales (26-29).

Habitualmente, la expresión de E-cadherina y sus moléculas asociadas, las cateninas, presentan positividad intensa en tejidos normales y carcinomas bien diferenciados, mientras que es débil ó nula en carcinomas poco diferenciados con fuerte comportamiento invasivo.

Son varios los factores relacionados con la modificación del complejo E-cadherina-catenina. Entre ellos destacan las mutaciones en el gen CDH1 (carcinoma gástrico, carcinoma lobulillar de mama y carcinoma gástrico familiar) (30), la metilación de la región promotora del gen CDH1, que bloquea la expresión de dicho gen, (genes supresores tumorales, como APC, VHL ó Rb) (31); y los cambios transcripcionales, que

causan represión del promotor de la E-cadherina por parte de factores de transcripción aberrantes, como Snail, SIP-1 y el Twist. La pérdida de factores de transactivación del promotor de la E-cadherina, asociado con el retinoblastoma y con el tumor de Wilms (32); y las modificaciones de la estructura y función del complejo E-cadherina/cateninas facilitan que la célula alterada pierda el fenotipo epitelial y adquiera capacidad de invasividad (33).

1.2.Twist

En los últimos cinco años, se han sugerido que genes implicados en el desarrollo embrionario (zinc fingers, snail, slug, SIP-1, twist...), se desregulan durante la tumorigénesis, (23, 24), iniciándose un proceso de desdiferenciación y reprogramación transcripcional, seguidos de la activación de señales de supervivencia y proliferación tumoral, a través de los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), endotelial (PDGE), IGF-IRm PI3K, quinasas reguladoras, cadenas y vías proinflamatorias, etc....que inducen a la progresión y EMT tumoral (25,34).

Estos reguladores genéticos en situaciones de anormalidad actúan reprimiendo la expresión de e-cadherinas y facilitando la de n-cadherina, dando lugar al inicio de la EMT (24).

Vernon et al. realizaron estudios con cuatro líneas celulares isogénicas tumorales, derivadas de una sola, utilizando tecnologías de micromatrices tisulares y compararon los niveles de expresión o actividad de cada gen (23), y advirtieron que la actividad genética variaba con la fase de metástasis en que se encontraba el tumor, y que había activación de ciertos genes en las células metastásicas, y represión de éstos en el tumor primario (23).

Entre los diferentes genes reguladores de la embriogénesis destacan los siguientes: snail, ZEB1, ZEB2, E47, slug y Twist; habiéndose observado que cada uno de éstos presenta una mayor actividad en las distintas etapas que comprenden el proceso de EMT.

Así, el snail1 y ZEB2 se activan al inicio del proceso invasivo, desempeñando papel en los primeros pasos. Los snail2, E47 y ZEB1, favorecen el fenotipo migratorio, e invasivo. Twist desempeña un papel fundamental en los últimos pasos del proceso metastásico, promoviendo la entrada de las células cancerosas en el torrente sanguíneo (intravasación), así como su supervivencia, una vez separadas del foco primario (22).

Una vez establecidas en su nueva ubicación, las células cancerosas pierden las recientes características fenotípicas mesenquimales adquiridas y vuelven a adoptar rasgos epiteliales, formando nódulos organizados. Fenómeno inverso al ya conocido como EMT (34).

El Twist es uno de los reguladores de genes más potentes de la morfogénesis embrionaria, ya que controlan gran variedad de procesos celulares, necesarios para la adecuada formación del mesénquima, mesodermo, gastrulación y crestas neurales (35). Su actividad confiere comportamiento invasivo a una tumoración durante el proceso de tumorigénesis. Su inhibición, por el contrario, implica reducción de la intravasación de células tumorales; hecho que no influye en el grado de proliferación celular, pero sí provoca una disminución del potencial metastásico de las celulares tumorales (23).

En los tejidos normales, el twist permanece inactivo. En cambio, durante el proceso de tumorigénesis, las células cancerígenas reactivan la proteína Twist, proporcionando capacidad de movimiento e invasión (24). En el año 2004 se descubrió que la proteína derivada de este gen no se expresa en las células normales ni en el cáncer primitivo, pero que está sumamente activa en los tejidos metastásicos.

El gen Twist se localiza en el cromosoma 7q21.2 y codifica una proteína de la familia hélice-bucle-hélice básica (bHLH), que actúa como factor de transcripción.

Las proteínas bHLH se unen a una secuencia llamada caja E, CANNTG, permitiéndoles actuar como reguladores de muchos linajes genéticos en diversos procesos de diferenciación, ya sea como reguladores positivos o negativos y desempeñan un importante papel en la neurogénesis y la miogénesis (24).

Se han descrito tres familias de bHLH: A, B, C. La proteína humana Twist presente en vertebrados pertenece a la familia B, donde se identifican dos subtipos de twist (1 y 2), ambos implicados en la diferenciación celular de músculo, cartílago y células osteogénicas. Las mutaciones en la secuencia del gen que codifica twist 1 en vertebrados se han relacionado con enfermedades como el síndrome de Saethre-Chotzen (SCS), trastorno hereditario autosómico dominante caracterizado por anomalías en las extremidades y cabeza. En cambio, las mutaciones en la secuencia que codifica twist 2 se han encontrado sobreexpresadas en la leucemia linfocítica crónica (24).

La pérdida de e-cadherina secundaria a la actividad de twist, se lleva a cabo mediante la unión de ésta a los sitios e-box de la cadherina, provocando la ocupación del interruptor que los activa o bien bloqueando a aquellos que promocionan su activación (23,24), con la consecuente pérdida de la adhesión célula-célula. Esta pérdida de acción puede revertir mediante el aporte exógeno de la e-cadherina, pero sin conseguir

completamente revertir la transición epitelio-mesenquimal (34). Vernon et al. colocan al twist en una larga lista de proteínas reguladoras capaces de influir en la reactivación de las células cancerosas en fase latente, logrando progresión y avance en los pasos de la tumorigénesis (23).

Además de su función sobre la e-cadherina, el twist se ha establecido como agente antiapoptótico por su bloqueo de la vía ARF/p53; la cuál es activada en condiciones normales ante el crecimiento no controlado de células anormales, actuando como método de autoconservación, induciendo a una muerte celular programada (24).

El bloqueo de la vía ARF/p53 tiene su base bioquímica en una reducción de la expresión del agente supresor de tumores (ARF), junto con una inhibición de la p53, secundaria a modificaciones de la transcripción y post-traduccionales, como son la fosforilación y la acetilación; inhibiendo así la respuesta natural ante el estrés celular y daños en el ADN originados por los oncogenes.

El desarrollo de una tumoración maligna, se debe a una co-expresión o coordinación oncogénica, donde la hiperproliferación estimulada por un oncogén se asocia a la inhibición de la capacidad apoptótica. En el neuroblastoma, la hiperproliferación inducida por N-myc se asocia a expresión de Twist-1 y su efecto antiapoptótico se produce por bloqueo de la vía ARF/p53. Datos recientes han demostrado que la sobreexpresión de twist-1 y su función antiapoptótica se observa en una gran variedad de tumores, tales como cáncer de mama, próstata, carcinomas gástricos, melanomas, osteosarcomas, rabdomiosarcomas, síndrome de Sezary y enfermedades de células CD4 (24).

El carácter invasivo que la expresión de Twist-1 confiere a las células tumorales, lo sitúan como un importante regulador de la resistencia de las células del cáncer de mama a los agentes quimioterápicos (22,35).

La sobreexpresión de Twist-1, asociada a co-expresión de otros reguladores genéticos de la embriogénesis, como snail e SIP-1, se han relacionado con la invasividad, a través de la pérdida de e-cadherina y ganancia de N-cadherina en el cáncer gástrico humano (25); y como un factor de mal pronóstico en el melanoma (24). Por otro lado, la reducción de Twist-1 en el ARNm, disminuye la incidencia de metástasis pulmonar de cáncer de mama (24).

Algunos estudios han demostrado que en tumores con e-cadherina conservada, la tasa de supervivencia a los 5 años es mayor en el subgrupo que muestra baja expresión de twist. Por otro lado, otro estudio ha mostrado como la alta expresión de twist es significativamente mayor en lesiones metastásicas que en tumores primarios (35).

La expresión conjunta de snail, slug y twist ha sido descrita en varios tipos de tumores, como el cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer colorrectal, de esófago, cáncer de vejiga, del tracto superior urotelial y de cuello uterino.

Snail y twist son reguladores embriogénicos similares, participando ambos en el inicio del EMT.

Expresión de snail se ha identificado en el 54% de los tumores y la de twist en el 50% (snail p: 0,014 y twist p: 0,006), existiendo relación estadísticamente significativa entre expresión de snail y twist, con el descenso de e-cadherina y aumento de expresión de n-cadherina; de tal modo que la co-expresión de ambos reguladores embriogénicos ha sido relacionada como factor de mal pronóstico, con una mayor tasa de recurrencia y menor tiempo libre de enfermedad en pacientes con tumores receptores de estrógenos (RE) positivos (36). Estos resultados apoya la conclusión enunciada por Yuen et al. (37) que señala que la expresión de ambos factores independientemente no presentan resultados concluyentes, mientras que su combinación manifiesta una relación estadísticamente significativa con la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de mama.

Concluimos este apartado extrapolando la idea de que Twist es un importante regulador genético capaz de modular de manera determinante el desarrollo del cáncer, mediante el bloqueo o inhibición de los sistemas de seguridad celulares ante una actividad mitótica anormal, así como mediante la alteración de la capacidad de adhesión célula-célula (24).

La inhibición de Twist inducida por drogas, así como el control de su activación y el conocimiento del componente molecular que participa en la EMT aumentarían la sensibilidad de las células anormales a la apoptosis, confiriendo una importante barrera contra el cáncer y ayudaría a abrir nuevas vías de investigación en el desarrollo de tratamientos (22,24).

1.3.ABCG2

La cirugía es el principal tratamiento y el más efectivo para el cáncer de mama en la actualidad. Sin embargo, muchos pacientes reciben tratamiento adyuvante (post-operatorio), el cual reduce el riesgo de enfermedad loco-regional y disminuye la tasa de recurrencia del tumor, siendo su principal objetivo proporcionar un beneficio máximo de supervivencia con la mínima toxicidad (38). La terapia adyuvante incluye diversas opciones de tratamiento, entre los que destacan quimioterapia adyuvante, radioterapia, terapia endocrina y agentes biológicos.

La terapia sistémica aumenta el tiempo libre de enfermedad en los pacientes, pero no presenta un efecto curativo radical de aquellos con enfermedad avanzada o metastásica, así como tampoco beneficia a pacientes con enfermedad localizada de cáncer de mama.

Así pues, obtenemos la idea de que el tratamiento adyuvante es considerado en la actualidad como complementario de la cirugía, siendo ésta última la que presenta resultados de curación.

Uno de los aspectos más estudiado por los investigadores en los últimos años, respecto a la terapia adyuvante es la resistencia intrínseca a la quimioterapia, convirtiéndose así en una causa importante de fracaso del tratamiento sistémico (39).

El fenotipo de resistencia al tratamiento adyuvante se ha relacionado con un aumento de la expresión de los genes “ATP-binding cassette” (ABC), cuyas proteínas actúan como transportadores de fármacos dependientes de gradiente. Los ABC llevan a cabo el transporte de un sustrato desde el interior, hacia el exterior de la célula atravesando la membrana celular contra gradiente, mediante el empleo de energía (40).

Dentro de los genes ABC, destacamos el perteneciente a la subfamilia G2, conocido como ABCG2 (ATP-binding cassette subfamilia G2).

La sobreexpresión de ABCG2 ha sido relacionada con un fenotipo de resistencia a los fármacos de la terapia adyuvante, por lo que también se le conoce como “proteína de resistencia” (BCRP).

En 1998, Doyle et al. clonaron el primer gen conocido responsable del fenotipo de resistencia al tratamiento adyuvante, el gen BCRP. Más tarde, se descubrieron en diferentes laboratorios dos moléculas transportadoras que fueron conocidas como ABCP, para el transportador ABC altamente expresado en la placenta (41), y MXR,

para el gen de resistencia a mitoxantrona (42) y se advirtió que los tres genes (BCRP, ABCP y MXR) prácticamente tenían la misma secuencia (43).

El gen ABCG2 se localiza en el cromosoma 4q21-4q22 (44), consta de 16 exones y 15 intrones y su proteína contiene 655 aminoácidos (45).

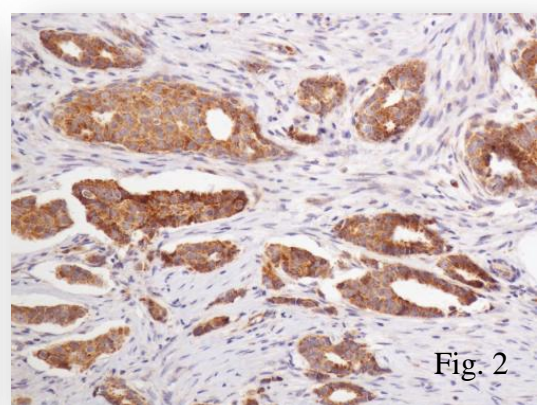
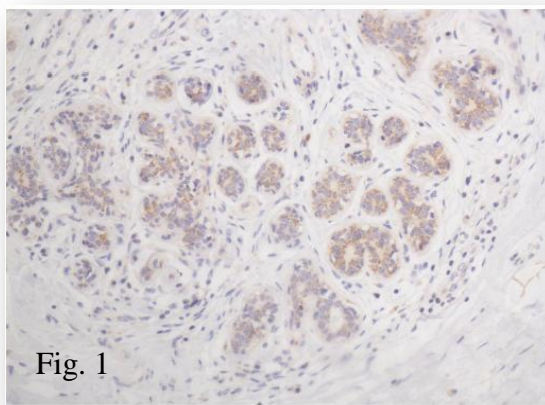
En condiciones fisiológicas, el gen ABCG2 se expresa en la placenta (en las células del sincitiotrofoblasto), así como en el colon, el intestino delgado, canalículos biliares, el tejido mamario, el endotelio venoso, y en capilares (46). En tumores, la proteína ABCG2 desempeña un importante papel en el transporte de fármacos al espacio extracelular, relacionándose su sobreexpresión con el fenotipo de resistencia a los fármacos adyuvantes. Esta situación convierte al ABCG2 en un importante factor predictivo en la quimioterapia en el cáncer de mama (43) así como en diana terapéutica en la búsqueda de una mejora en la efectividad de los tratamientos administrados al paciente (47-50).

En la actualidad, el desarrollo de los anticuerpos anti-ABCG2 ha permitido su identificación celular (citoplásmica y de membrana) mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los parámetros valorados son el porcentaje celular teñido, y la intensidad de esa tinción, obteniéndose como resultado final el producto de ambos parámetros.

La proporción de células tumorales teñidas se puntúa de la siguiente manera: 0 (ausencia de células tumorales positivas); 1 ($\leq 30\%$ positivo células tumorales); 2 (31 a 50% de células tumorales positivas); 3 (51 a 80% las células tumorales positivas) y 4 (> del 80% de las células tumorales positivas) (51). La intensidad de la tinción se clasifica en base a la siguiente criterios: 0 (-, ausencia de tinción), 1 (+, tinción débil), 2 (+ +, tinción moderada) y 3 (+ + +, Tinción fuerte) (51).

El índice de tinción (SI) se calcula como el producto de la puntuación de intensidad de la tinción y la proporción de células tumorales positivas, obteniéndose los posibles siguientes valores: 0,1,2,3,4,6,9 o 12. Se considera como punto de corte positivo una puntuación final ≥ 4 , siendo una puntuación ≤ 3 utilizada para indicar una expresión ABCG2 bajo, y la puntuación 0, implica la expresión negativa.

La expresión de ABCG2 en el tejido glandular mamario normal es de bajo nivel o prácticamente ausente (Figura 1), mientras que los tumores con alto grado y con componente infiltrante presentan una mayor expresión (Figura 2). Existe relación significativa entre expresión de ABCG2, y nivel de invasión tumoral, consagrándose este biomarcador como factor pronóstico, cuyos altos niveles de expresión indican mala respuesta al tratamiento adyuvante, así como menor tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia.



Altos niveles de expresión de ABCG2 se han señalado con frecuencia en los tumores de mama, del tracto digestivo, endometrio y melanoma (52) y cáncer de pulmón (53, 54).

La expresión de ABCG2 se correlaciona con la alta expresión de HER2, lo que aporta solidez a la idea de que ABCG2 se correlaciona con un peor comportamiento biológico y una mayor agresividad clínica. Además, la expresión de ABCG2 se correlaciona con metástasis ganglionar y clínica, lo que sugiere que los pacientes con alta expresión de ABCG2 pueden tener un peor pronóstico (43,53).

La correlación significativa entre ABCG2 y HER2 puede sugerir que ABCG2 no actúa sólo como un transportador de la familia ABC, sino que éste se descubre como un nuevo biomarcador de alto potencial capaz de predecir la evolución biológica del tumor, la progresión clínica y la eficacia a la quimioterapia.

Este transportador permite el empleo de una terapia personalizada más eficaz para el paciente, evitándole efectos secundarios tóxicos. Así pues, los últimos estudios han definido que ante una fuerte expresión de ABCG2 el tratamiento adyuvante

administrado debe ir acompañado de los antagonistas de ABCG2, para asegurar una mayor efectividad y eficacia en el tratamiento (43).

Otro de los avances que han aportado los últimos estudios se centra en la inhibición del efecto de la sobreexpresión de ABCG2, no mediante el aporte de antagonistas, sino a través del control y regulación del promotor de ABCG2.

El promotor de este transportador es regulado por diversos factores, entre los que destacan los estrógenos (55), la hipoxia (56) y los receptores de andrógenos (57). El control y regulación de este transportador se lleva a cabo mediante la vía de señalización PI3/Akt (56).

1.4.Caveolina

La caveolina es una proteína que influye en la adquisición de las características propias de las células cancerosas, lo cual sugiere que la caveolina presenta un importante papel en la progresión tumoral (Figura 3).

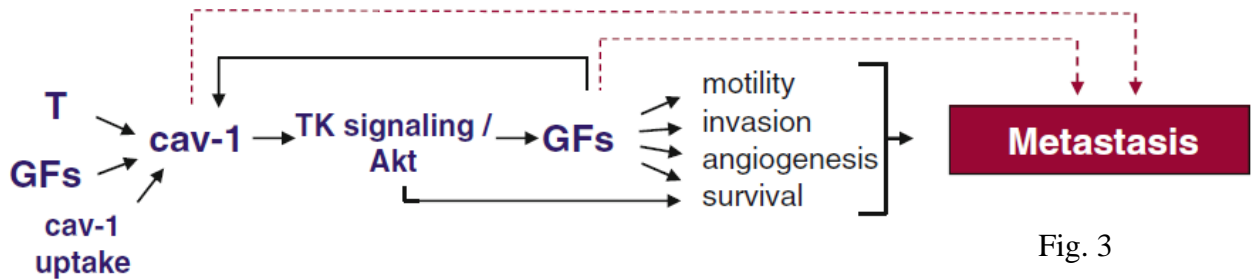


Fig. 3

La caveolina es una proteína integral de la membrana plasmática que se encuentra asociada o adherida a los caveolae, siendo su proteína principal (58,59). Las caveolas, también son conocidas como “cuevas pequeñas”; son invaginaciones en la membrana plasmática descritas hace más de 50 años (60,61). (Figura 4)

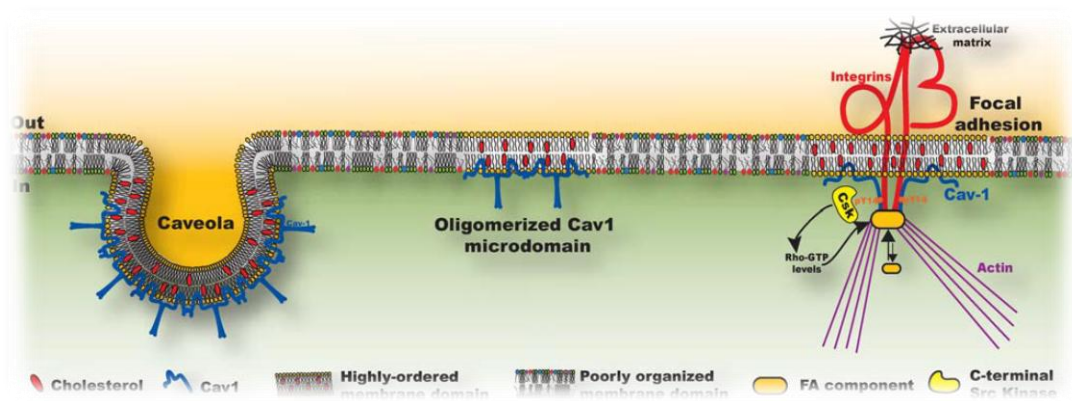
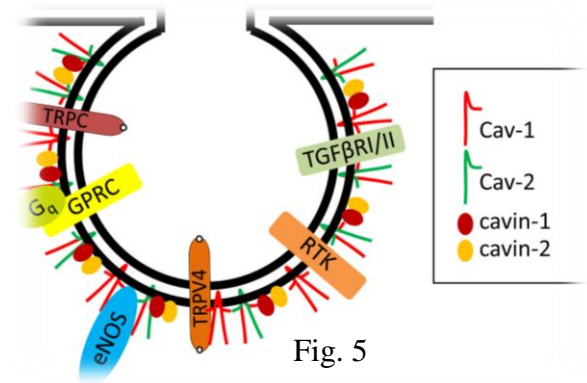


Fig. 4

Se distinguen tres isoformas de caveolina (Figura 5); Cav1, componente estructural clave de las caveolas, cuya expresión es esencial para la biogénesis de caveolae (62); Las Cav2 y Cav3 pertenecen a la misma familia y se diferencian en sus patrones de expresión en diferentes tipos de células (63). Cav2 es capaz de formar un complejo heteroligomérico estable con Cav1



(64), pero no se considera esencial en la biogénesis de caveolae (65,66). La Cav3 se encuentra localizada en músculo (67), y células gliales (68) y se caracterizan por participar en la biogénesis de caveolae de aquellos tejidos en los que se encuentra expresado (69).

La fosforilación del dominio N-terminal de la caveolina-1 en la tirosina 14 (Y14) por la familia Src quinasas, permite la unión de proteínas SH2-adaptadoras (C-src, grb-7), que activan la proliferación y el anclaje, así como el crecimiento independiente a través de la cascada de las moléculas de señalización Ras/Raf/Erk (70).

La señalización de numerosas proteínas tales como c-Neu (71), H-Ras (72), eNOS (73), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e Id-1, entre otros, han sido vinculados estrechamente a la Cav1 y su CSD (74).

La caveolina se considera una proteína que constituye el andamiaje de la membrana plasmática, y que participa en la biogénesis de caveolae, en el proceso de absorción de lípidos y transporte de éstos a través de vesículas y vacuolas lipídicas, así como en la regulación del ciclo celular (75), del transporte transcelular y la señalización endotelial de las células (76,77), tumorigénesis, así como facilitando la entrada a ciertos virus en el interior de las células de mamíferos (78-80).

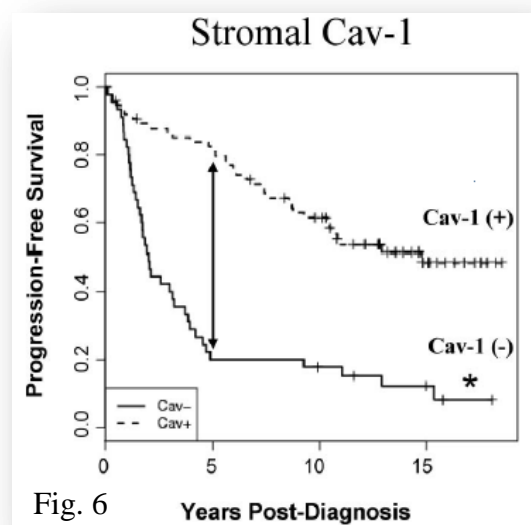
Cav1 actúa como un supresor tumoral, un marcador pronóstico, cuya positividad indica protección frente a la progresión del cáncer. La expresión de caveolina-1 en el cáncer humano ha sido documentada y evaluada en numerosos estudios, de los cuales la gran mayoría han valorado su expresión a nivel estromal de los fibroblastos tumorales; siendo muy pocos los estudios que hacen referencia a su expresión epitelial (81, 82).

Su expresión depende del tipo de tumor y el estadio del mismo. De esta manera, mientras que en sarcomas y carcinomas infiltrantes de mama en estadio avanzado (70) se observa expresión discreta o nula; el tejido mamario no neoplásico y el carcinoma in situ expresan caveolina de forma intensa en el estroma (70).

Son numerosos los artículos en los que se valora la expresión de Cav1 estromal, coincidiendo la mayoría en valorar como factor principal la presencia o ausencia de tinción en primer lugar, y en el caso de la misma, centrarse en el grado de intensidad, confiriendo valores numéricos comprendidos entre 0 y 2. Aquellos casos con intensidad grado 2, se procederá a valorar el porcentaje de fibroblastos peritumorales positivos, rebajando a un grado 1 en el caso de que éste sea inferior al 30% y manteniendo el grado 2, en el caso de que lo supere (70).

Por otro lado, han sido descritos carcinomas de células escamosas (83,84), y carcinomas metastásicos (85-87) asociados a una expresión muy intensa de caveolina. Esta sobreexpresión de caveolina-1 en las células tumorales metastásicas fue relacionada con mayor resistencia por parte de las células tumorales al estrés (88), a la terapia radioactiva (89), y a la apoptosis (90), con el cúmulo de células con ADN aberrante; y alteración en la regulación e influencia de las vías de señalización, como IGF-1/PI3K/AKT) (91,92).

La ausencia de caveolina-1 estromal peritumoral, se ha relacionado con mal pronóstico, menor supervivencia global (Figura 6), menor período libre de enfermedad y mayor recurrencia, en pacientes con carcinomas gastrointestinales del tracto superior, renales (93,94), de próstata (95), mama, pulmón (84,96, 97) , cerebro, vía biliar (98) y glándula salival (99).



Así pues, se confirma el importante papel de las caveolinas en la progresión del cáncer, es decir, en la tumorigénesis mediante la inhibición y alteración de las moléculas de señalización.

La caveolina-1 ha sido relacionada con el bloqueo de la progresión tumoral y metástasis (100), angiogénesis, alteración de la capacidad de adhesión celular, inflamación e invasión, a través de mecanismos moleculares. Siendo su principal función la disminución de la viscosidad de la membrana celular, que da paso a la fluidez y motilidad celular (101), bloqueando así la migración celular.

Ese proceso se acompaña de un estímulo de inducción de endocitosis, y la internalización de la caveolina-1 en compartimentos intracelulares, donde la cav-1 se somete a un proceso de degradación en los endosomas y lisosomas (102).

Así pues, son los eventos moleculares, los que pueden orientar a la caveolina y redirigirla como supresor de tumores o inductor de la progresión de la tumorigénesis (102).

La caveolina-1 se relaciona con la adhesión intercelular por su interacción con las integrinas (103); de manera que cav-1 se conecta a los componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina y la endostatina lo hacen con el citoesqueleto subyacente. De este modo, la caveolina-1 funciona como un sensor mecánico de la integrina mediada por la unión de la célula a la matriz extracelular.

Estudios recientes confirman a la caveolina-1 como protectora contra el estrés celular y la inflamación; así como promotora de supervivencia celular, mediante la regulación postraducciona de las vías de señalización IGF-1/Insulin/PI3/AKT y NF- κ B.

La implicación de la caveolina-1 en el mecanismo de activación de la vía de señalización NR- fue validada y confirmada en pacientes con cáncer de mama, que presentaban una resistencia autoadquirida a los inhibidores tirosina kinasa ErbB2, como el Lapatinib; del que se obtuvo como idea principal la relación entre su ausencia de expresión y el mal pronóstico, reflejando el papel que la cav-1 juega en el tratamiento en el cáncer de mama.

Como conclusión, merece la pena destacar el papel multidimensional de la caveolina-1 en la biología del tumor. Sin embargo, todavía se requieren estudios para perfeccionar y dilucidar claramente su función en la patogénesis del cáncer de mama en seres humanos.

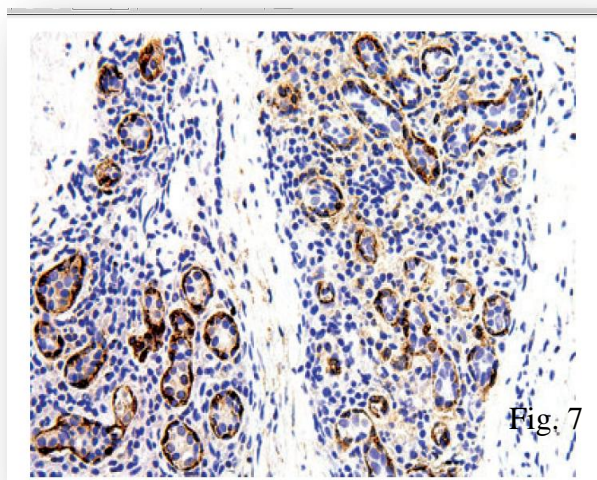
La manipulación terapéutica de la caveolina-1 produce un importante impacto en múltiples vías de señalización; lo cual sitúa a esta proteína integral de membrana como importante objeto de estudio como ventana terapéutica (104,105), para el desarrollo de la terapia anti-cáncer (106).

1.5.CD10

El CD10 es una metaloproteinasa dependiente de zinc con un peso molecular de 110 KDa. Se le conoce como el “antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común” (CALLA). También se han referido al CD10 como “metaloendopeptidasa neutra” en el riñón, así como “encefalinasa” en el cerebro (107).

El término CALLA es debido a su expresión constante en la superficie celular de la leucemia linfoblástica aguda (108,109), lo cual es un hallazgo de notable utilidad diagnóstica (110).

Las células tumorales inducen la sobreexpresión de estas metaloproteinasas en el estroma (111). Este aumento de expresión conduce a la degradación de la matriz extracelular, tumorigénesis, apoptosis y proliferación, así como a la interacción con las células cancerosas, acelerando el ciclo celular y activando la motilidad de las células tumorales. Esta cascada de acontecimientos tiene como resultado el inicio de un bucle cerrado centrado en la degradación, la invasión y la metástasis tumoral (112). Este proceso puede verse influenciado por varios factores entre los que destacan las interleuquinas IL-1 y IL-6.



El CD10 se expresa en gran variedad de células normales no neoplásicas, como células precursoras de centro germinal, enterocitos, células epiteliales prostáticas y de la vesícula biliar, así como células mioepiteliales de las glándulas mamarias y salivares (113) (Figura 7).

La expresión de CD10 ha sido descrito también en células estromales en el cáncer de mama, (114), en el cáncer de próstata y vejiga urinaria (115,116), estómago y colorrectal (117,118), en el sarcoma del estroma endometrial (119,120) así como en el nasofaríngeo (121), y en el hepatocelular carcinoma (122-124).

La evaluación inmunohistoquímica de CD10 considera tinción negativa, aquella que se presenta de forma débil, ya sea de forma difusa o focal, o fuerte en menos del 30% de los núcleos de las células estromales del cáncer de mama. Por el contrario, se considera positiva aquella tinción fuerte en más del 30% de los núcleos de las células estromales (114). Obteniendo valores numéricos comprendidos entre 0-2. Siendo 0: negativo; 1: positivo débil, y 2: positivo intenso.

Otros estudios consideran CD10 con expresión positiva o negativa, en función de si la tinción ocupa más o menos del 10% de las células estromales del cáncer de mama (125).

CD10 presenta tinción positiva en condiciones no neoplásicas en las células basales mioepiteliales de la glándula mamaria durante su desarrollo y tras su maduración, considerándose un marcador específico de componente mioepitelial (126) (figura 8). Otros componentes de la mama, como las células epiteliales y los fibroblastos, son negativos en condiciones fisiológicas. (127).

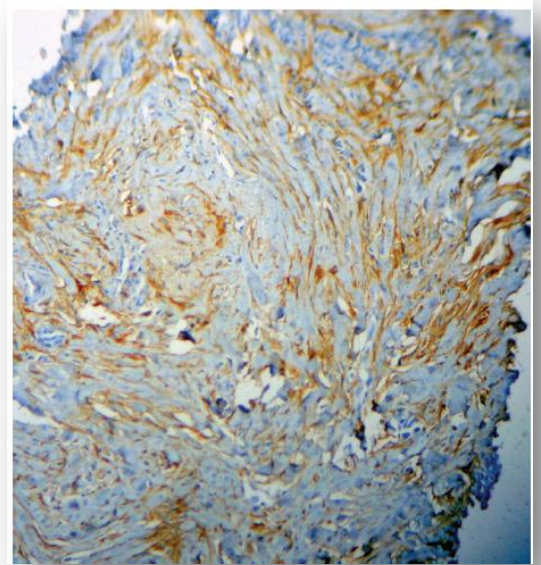


Fig. 8

Se ha demostrado una mayor expresión de CD10 a nivel estromal en el carcinoma de mama de estadio avanzado (126). Este hallazgo se asocia con el tamaño tumoral, el estadio, el grado histológico, la presencia de ganglios positivos y metástasis a distancia, negatividad para receptores hormonales de estrógeno, así como con la pérdida de moléculas de adhesión como la E-cadherina (125).

Por tanto, positividad al CD10 en las células estromales en el cáncer de mama es un factor pronóstico adverso que se relaciona directamente con un menor tiempo libre de enfermedad y una menor supervivencia (116) (Figura 9).

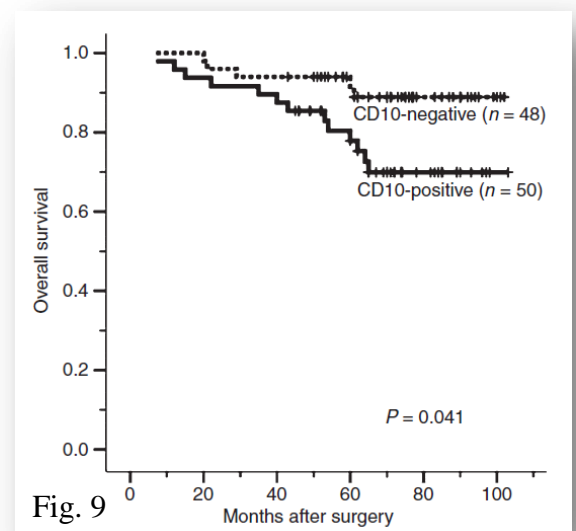


Fig. 9

En otras neoplasias, como en el carcinoma colorrectal y el carcinoma hepatocelular, o el tumor fibroepitelial de la mama de tipo filodes (128); la expresión de CD10 en las células estromales, también orienta a peor pronóstico con menor supervivencia y mayor tendencia al desarrollo de metástasis (107,114,117,128,129,130).

Para concluir, la expresión de CD10 se correlaciona intensamente con otros biomarcadores cuya expresión son indicativos de mal pronóstico, como el HER2 y p53 positivo y Ki67 elevado; así como con expresión negativa de receptores de estrógenos, y progesterona (131). El CD10 es un marcador independiente de mal pronóstico, y menor supervivencia, que puede ser utilizado como diana terapéutica en el desarrollo de tratamientos innovadores contra el cáncer de mama (107,114,125,131).

1.6.CD44

El CD44 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a una familia de receptores de superficie celular, los cuales reconocen al hialuronato como su principal ligando (132-137). El ácido hialurónico es un polímero de glicosaminoglicano no sulfatado abundante en la matriz extracelular, que rodea a la célula cancerosa y no cancerosa, y tras su adhesión al receptor transmembrana promueve el crecimiento y la propagación de las células tumorales (138).

El CD44 presenta varias isoformas. Estas variantes se constituyen por la inserción de un aminoácido adicional en el dominio extracelular de la proteína (139,140) mediante el empalme de uno o más exones alternativos entre los exones estándar 5 y 6 (141).

Las isoformas que contienen el exón v6 codificado (CD44v6), inducen a la diseminación del tumor en el carcinoma de páncreas de la rata (142), en el cáncer de colon en seres humanos (143,144), así como en linfomas no-Hodgkin en humanos (145). Variantes homólogas del CD44v6 sobreexpresado en otros tumores implican un papel importante en la progresión tumoral y en la metástasis en los seres humanos.

Así pues, se relaciona la expresión de CD44v6 con un mal pronóstico de varios tumores, concretamente en aquellos de origen gastrointestinal (146).

La unión del receptor a su principal ligando, hialuronano-CD44, media la adhesión celular a la matriz extracelular, y además, activa un proceso basado en la internalización del ligando en el interior de la célula, desencadenándose un proceso de degradación del hialuronano, lo cual permite una remodelación de los tejidos, así como una estimulación de la proliferación celular (135, 147,148). Además, CD44 juega un importante papel en la migración de algunas células neoplásicas, en especial de los linfocitos (149). De manera que esta función proliferativa y migratoria conduce a la progresión de varios tumores (136).

Se ha señalado que la variante exón 6 promueve la metástasis de las células cancerosas del cáncer de mama (150), donde el aumento de los niveles en suero de CD44v6 se correlaciona significativamente con el estadio del tumor, y la presencia de metástasis ganglionares y a distancia (151).

La evaluación de CD44 se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas (141), que reflejan expresión de membrana de varias isoformas en las células epiteliales de los conductos neoplásicos mamarios (Figura 10). El tejido mamario no patológico no expresa ninguna isoforma de CD44 (152).

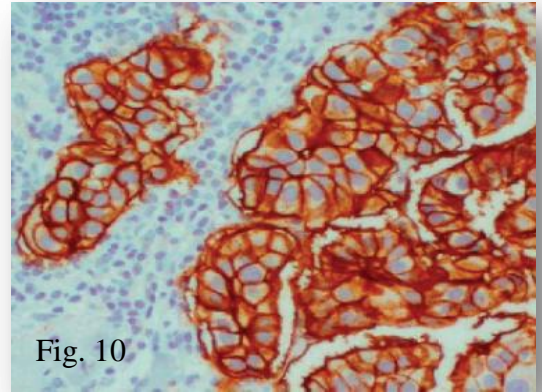


Fig. 10

Tras diversos protocolos de interpretación, se ha realizado una clasificación que combina dos parámetros: intensidad de la tinción y porcentaje de tejido tumoral teñido. De esta manera, se consideran varias categorías: 0: (<5%), 1: (5-25%), 2: (25-75%), y 3: (>75%) (141).

Otros estudios, valoran la expresión inmunohistoquímica en base al producto del porcentaje teñido y la intensidad de la tinción (153), o sólo en base a tinción focal o generalizada (154).

Algunos estudios sugieren que la expresión de CD44 y el CD44v6, no aporta suficiente información como para ser útiles como indicadores pronósticos en el cáncer de mama en estadios iniciales a nivel individual; siendo su función revalorizada y ensalzada en presencia de coexpresión con otros marcadores, como los receptores de estrógenos (152). De manera que en la actualidad, las diferencias de opiniones en las hipótesis enunciadas, confieren al valor pronóstico de la expresión del CD44 y CD44v6 en el cáncer de mama, un significado confuso y controvertido.

Aún así, la mayoría de los estudios, coinciden que la expresión positiva de CD44v6 es un marcador importante y de utilidad, en la indicación de mal pronóstico en mujeres diagnosticadas de carcinoma de mama en estadio inicial, con correlación significativa entre sobreexpresión de isoforma, y una supervivencia más corta (155-160) (Figura 11).

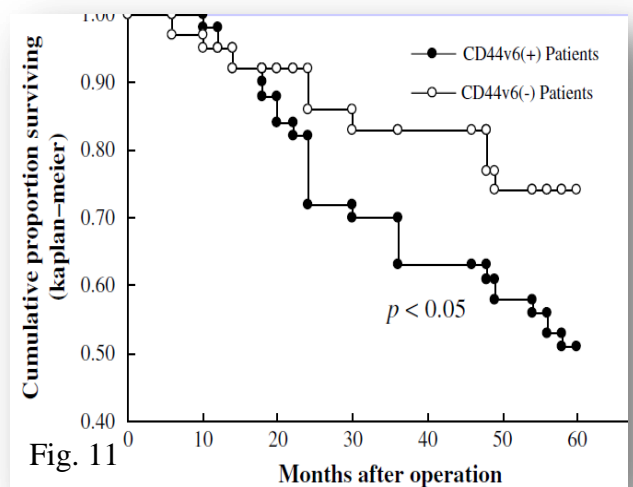


Fig. 11

En conclusión, la expresión del CD44v6 se correlaciona directamente con el tamaño del tumor, las metástasis de ganglios axilares, el TNM; así como inversamente, con la supervivencia global.

1.7.CD117

El c-KIT es un proto-oncogen localizado en el cromosoma 4q11-21, que codifica un receptor transmembrana tirosínquinasa de 145 KDalton (161).

Su estructura consta de 5 dominios tipo inmunoglobulina extracelular y un dominio de escisión de la tirosin quinasa y su estructura se encuentra estrechamente relacionada, compartiendo una similitud estructural, con el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor estimulante de receptores de colonia (161).

Este receptor transmembrana se une a un ligando, llamado factor ligando o KIT ligando (162,163). La interacción del receptor c-kit y su ligando da lugar a la activación del dominio quinasa KIT, con la consecuente fosforilación de residuos de tirosina que transactiva una gran variedad de señales, involucradas en la proliferación, la apoptosis y la tumorigénesis (162,164).

Cómo receptor transmembrana, el c-kit desempeña diversas funciones en la hematopoyesis, melanogénesis, espermatogénesis, y en el desarrollo de las células intersticiales de Cajal (165).

En condiciones normales, el c-kit se expresa en células madre hematopoyéticas, mastocitos, melanocitos, células intersticiales de Cajal, epitelio normal de glándula mamaria. Su ausencia de expresión se ha referido en localizaciones como pulmón, endocérvix, páncreas, estómago e intestino (166,167).

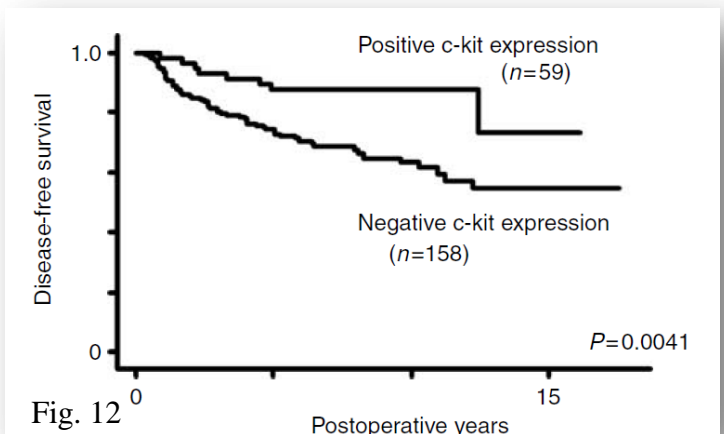
En situaciones patológicas, el c-kit se expresa principalmente en el tumor del estroma gastrointestinal (GIST), asociado a mutaciones en el gen c-kit (exones 9 y 11 principalmente) (168). También se ha señalado expresión de la proteína C-KIT en una gran variedad de tumores malignos, incluidos leucemia mieloide, carcinoma de pulmón de células pequeñas y seminomas (168-171).

En el carcinoma de mama no se han encontrado mutaciones del gen c-kit en el cáncer de mama; aunque se expresa en el epitelio de una glándula mamaria normal (172-176).

Así pues, mientras que el c-kit está implicado en el crecimiento y mantenimiento de un epitelio escamoso y glandular normal en determinadas localizaciones; éste pierde su expresión en el epitelio tumoral, como se advierte en el cáncer de mama, melanoma, cáncer de tiroides, y carcinoma renal de células claras y papilar (176, 177); siendo su expresión conservada en el carcinoma cromóforo de células renales (178).

Diversos estudios han confirmado y demostrado que el c-kit es altamente expresado en el epitelio mamario normal, pero sólo se expresa a niveles bajos o se pierde completamente en cáncer de mama primario o metastásico (174, 179,180,181,182). Debido a ello, el c-kit ha sido incluido dentro de los factores que pueden influir en la transformación de un carcinoma de mama in situ en cáncer invasivo, colocándolo como factor que juega un importante papel en la carcinogénesis de mama, y relacionando su ausencia completa de expresión con un carcinoma de mama invasivo en estadio avanzado. (161,181).

La figura 12 muestra como el resultado cuantitativo inmunohistoquímico de c-kit, es considerado como factor pronóstico, asociando ausencia de expresión con tumoración de alto grado y menor supervivencia global del paciente (182).



La expresión inmunohistoquímica de c-kit ha sido evaluado de diferentes maneras, considerando como método más estandarizado la combinación de dos parámetros: el porcentaje de tejido tumoral teñido, y la intensidad de la tinción (183).

0: Ausencia de tinción, o tinción en menos del 10% de las células del carcinoma.

1+: Tinción citoplasmática débil o moderada en el 10% o más, de las células del carcinoma a evaluar.

2+: Tinción citoplasmática fuertemente teñida, con o sin tinción de membrana en el 10% o más de las células tumorales del carcinoma a evaluar.

Mientras que la tasa de expresión de c-kit en tejido mamario normal es del 100% (Figura 13), su expresión se reduce progresivamente en los tumores benignos de la mama hasta encontrar ausencia total en cánceres invasivos (172) (Figura 14).

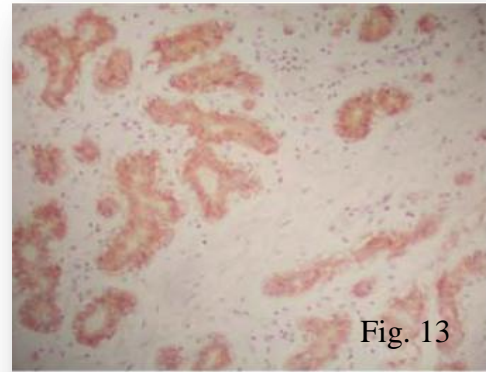


Fig. 13

Se ha relacionado la pérdida de expresión del c-kit con la presencia de metástasis ganglionares, observándose relación con el número de ganglios linfáticos metastásicos y mal pronóstico (181). Esta observación de pronóstico adverso también se ha encontrado en pacientes con adenocarcinoma de endometrio (184), carcinoma nasofaríngeo (185), carcinoma de células pequeñas de vejiga urinaria (186), cáncer de ovario (187), neuroblastoma (188) y carcinoma adenoide quístico parotídeo (189).

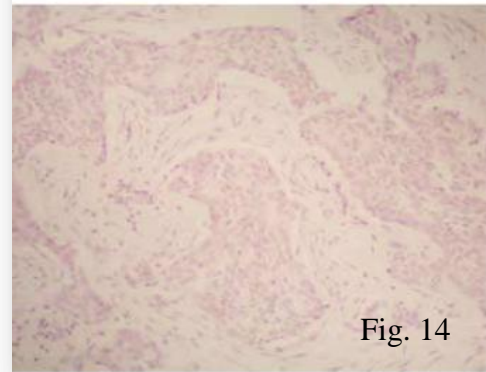


Fig. 14

La ausencia de expresión de c-kit en el cáncer de mama se ha relacionado tanto con otros biomarcadores, tales como fuerte expresión del Factor de crecimiento derivado de plaquetas y del HER2 (188,190).

Los carcinomas invasivos de mama que expresan c-kit (14%) (172, 179, 183, 191) son receptores de estrógeno y progesterona negativos, tienen alto grado nuclear, patrón sólido con comedonecrosis y HER2 positivo (192).

La importancia de la expresión de c-kit no sólo se limita a su función como factor pronóstico, sino que tiene interés terapéutico, ya que presenta pacientes para terapias de mayor agresividad en base a su resultado inmunohistoquímico. Este papel de diana terapéutica no sólo se limita al cáncer de mama sino que se extiende a diversas neoplasias malignas en el ser humano (182).

1.8.CDK2

La regulación de la proliferación celular es un proceso básico para el desarrollo normal, y la obtención de respuestas fisiológicas, así como para el control de la tumorigénesis. La progresión y proliferación ordenada de células a través del ciclo celular se debe a diversos factores, entre los que destaca la necesidad de existencia de un equilibrio entre las concentraciones de ciclinas activadas y ciclinas quinasas-dependientes (193).

En el funcionamiento normal del ciclo celular de las células eucariotas, tiene un papel especialmente importante la vía del gen RB. Actúa como un regulador negativo de la proliferación celular en las fases G0, G1 y S (194). Así pues, la pérdida del control de la fase de transición G1-S durante el ciclo celular da lugar al inicio del proceso de transformación oncogénica de las células humanas (195). La mayoría de los cánceres del ser humano se deben a alteraciones en alguno de los componentes que conforman la vía RB (196) y entre éstas se incluye el cáncer de mama.

Entre las alteraciones descritas en el carcinoma de mama en la vía RB destacan la alteración de la expresión de ciclinas, el silenciamiento de p16 y RB, y la alteración de la enzima fosfatasa 25 bis (Cdc25A) (196). Esta enzima degrada y elimina a los inhibidores de la serina y treonina, dando así lugar al depósito de estos residuos de quinasas dependientes de ciclina (CDK). Su sobreexpresión, junto con las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) almacenadas, ha sido relacionada con el desarrollo del cáncer de mama (197).

La regulación del ciclo celular se obtiene a partir de un equilibrio entre las concentraciones de ciclina activada y ciclina kinasa dependiente (CDK). Este equilibrio permite obtener un control de los efectos que inducen a la proliferación celular, frente a aquellos que la suprimen, alcanzando un término medio (198-201). De esta manera, el complejo ciclina-CDK, permite el paso de la célula por las distintas fases del ciclo celular. La fase inicial o preparatoria (G1, G2), la de síntesis de ADN (S), y la de mitosis (M) (193).

Existen cinco tipos de ciclinas que se sintetizan en las distintas fases del ciclo celular (ciclina A, B, C, D y E). Cada ciclina presenta un patrón único de expresión (193). La ciclina D facilita el movimiento a través de las fases más tempranas del ciclo, y en la transición G1/S. Esta activa la CDK4 y CDK6, participando en la regulación de la proteína supresora de tumores Rb (sintetizada por RB) (202).

La ciclina E actúa en la transición G1/S, induciendo al avance de las células hacia la fase M, y por lo tanto induciendo a su proliferación (203). La ciclina A, junto con la CDK-2, regula la progresión de las células a través de la fase S (204). La ciclina B1, se encuentra activa durante la fase G2 y M. Así pues, se confirma el papel de las ciclinas en la regulación del ciclo celular, y se explica y justifica el que sean considerados objeto de estudio para la obtención de nuevos tratamientos (193).

La alteración de alguno de los componentes anteriormente mencionados participa en la activación o inhibición del desarrollo tumoral, lo que convierte a las ciclinas en un marcador pronóstico (193).

Numerosos estudios han confirmado que en el carcinoma infiltrante de mama, los niveles de expresión de ciclina A, E y D1 en el ARNm de las células neoplásicas son mayores que los encontrados en las glándulas mamarias normales (195), permitiendo afirmar la existencia de una correlación entre la sobreexpresión de la ciclina A, D y E, y el desarrollo y progresión del cáncer de mama (205,206).

La ciclina E, que presenta altos niveles de isoformas de bajo peso molecular, ha demostrado ser actualmente el mejor marcador pronóstico de cáncer de mama; ya que influye de modo importante en la proliferación celular y la inestabilidad genética (207, 208).

Destacamos el papel crucial de CDK-2, formando complejos con la ciclina A y la ciclina E, permitiendo así el control del paso de la célula por la transición G1/S y la fase S (209,210).

El bloqueo del complejo ciclina E/CDK-2 interrumpe el paso de la célula en la fase G0, impidiendo que ésta complete su ciclo celular con una muerte programada, e induciendo de esta manera a un depósito celular por bloqueo de la apoptosis (211).

Se confirma así el CDK-2 como un marcador de mal pronóstico, que indica un menor período libre de enfermedad y menor supervivencia (195) (figura 15) y cuya sobreexpresión se relaciona con la pérdida del control del ciclo celular, la

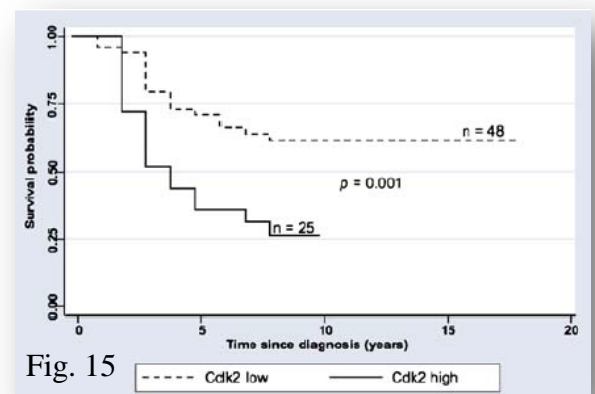


Fig. 15

proliferación descontrolada y la alteración de la tumorigénesis.

La evaluación del CDK2 se realiza mediante métodos inmunohistoquímicos, observándose un patrón de tinción nuclear, citoplásmico y/o de membrana celular y citoplasma (212). Los últimos estudios apoyan el valor de la tinción nuclear, evaluándose ésta, en base al porcentaje de tinción e intensidad.

Expresión positiva ha sido registrada en numerosos cánceres, entre los que destaca el cáncer de mama (213,214), pulmón (215), laringe, cavidad oral (216,217), cérvix y endometrio (218,219, 220) y ovario (221). Además, la sobreexpresión de la ciclina E y de CDK-2 durante la progresión del tumor se ha registrado también en melanomas malignos (193).

En el carcinoma de mama invasivo existe tinción intensa para CDK-2. Esta tinción disminuye en las neoplasias benignas, y prácticamente no se observa en los epitelios normales (212).

En el melanoma maligno, numerosos estudios han demostrado asociaciones con el desarrollo y progresión tumoral, registrándose una tinción muy fuerte e intensa en la metástasis de melanoma (222) (figura 16).

Concluimos que niveles altos de CDK-2 se relacionan directamente con un menor período libre de enfermedad, mayor recurrencia, menor esperanza de vida, y mayor número de ganglios linfáticos positivos, convirtiendo a CDK-2 en un posible biomarcador pronóstico en mujeres con cáncer de mama (195).

El papel importante que esta ciclina dependiente de quinasa desempeña como regulador del ciclo celular, la convierte en diana molecular para estudio e investigación, en la búsqueda de nuevos tratamientos contra la proliferación celular indiscriminada (195).

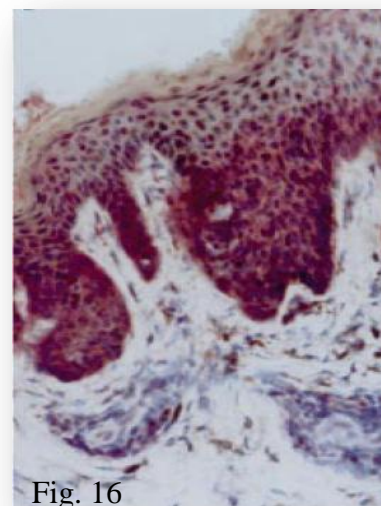


Fig. 16

1.9.Citoqueratina 5/6

Las citoqueratinas (CK) constituyen el mayor grupo de filamentos intermedios y junto con otros filamentos, forman el citoesqueleto de las células eucariotas. Algunas de sus funciones residen en el mantenimiento de la estructura de la célula epitelial, la protección ante traumatismos y la comunicación entre los componentes citoplasmáticos. Su expresión se lleva a cabo en forma de pares y varía de acuerdo con el tipo de célula (223).

Se clasifican numéricamente del 1 al 20, según su peso molecular y su punto isoeléctrico; distinguiéndose 2 grandes grupos de CK: Citoqueratinas de epitelios simples (CK7, CK8, CK18, CK19, CK20); y Citoqueratinas de epitelios complejos, como la piel (CK5/6, CK10, CK14, CK15).

Otro sistema de clasificación distingue entre CK ácidas o tipo I, que generalmente corresponden a CK de bajo peso molecular (CK9-CK20) y CK básicas o tipo II, que generalmente son CK de alto peso molecular (CK1-CK8).

Las citoqueratinas son útiles en el diagnóstico tumoral, permitiendo la identificación de adenocarcinomas y carcinomas derivados de epitelio escamoso no queratinizante.

La CK5/6 es una CK de alto peso molecular, presente en las células escamosas, que resulta útil para la tipificación de tumores de diferentes localizaciones. En la piel, la CK5/6 se expresa en la epidermis y en el epitelio de los anejos, por lo que su expresión está presente en neoplasias anexiales cutáneas, tanto benignas como malignas. No obstante, también se expresa débilmente, hasta en el 30% de las metástasis de adenocarcinoma, por lo que posee cierta utilidad en el diagnóstico diferencial histopatológico entre neoplasias cutáneas primarias y metástasis cutáneas de carcinomas viscerales (224,225).

La mayoría de los mesoteliomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas de células basales y carcinomas de células transicionales expresan CK5/6, mientras que la mayoría de los adenocarcinomas son CK5/6 negativos.

Habitualmente se considera positiva a la tinción de CK5/6 cuando existe: algún tipo de marcaje (débil o fuerte) citoplasmático o de membrana, en las células tumorales (226).

En la evaluación de su expresión se valoran dos parámetros: Intensidad, adoptando valores del 0 al 3; y porcentaje de células tumorales marcadas, con valores entre el 0 y el 100%. Ambos parámetros se multiplican obteniendo una puntuación final comprendida entre 0 y 300. Se considera expresión negativa el producto final igual o inferior a 10. Por el contrario, se considera expresión positiva a aquellos valores mayores a 10 (227).

En el carcinoma de mama el estudio de la expresión de CK5/6 forma parte de una nueva subclasificación de base molecular con significado pronóstico y predictivo (223).

El panel inmunohistoquímico propuesto por Nielsen (Figura 17) permite clasificar los carcinomas infiltrantes de mama en cuatro tipos; Luminal A, Luminal B, HER2, y basales o triple negativos, éstos últimos se caracterizan por presentar inmunorreacción negativa a receptores de estrógeno, progesteronas y HER2; y expresión de citoqueratina 5/6 (Figura 18)

Clasificación de Cáncer según panel Inmunohistoquímico definido por Nielsen:

Grupo	HER2	RE	CK 5/6-EGFR
HER2	+	+/-	+/-
Luminal	-	+	+/-
Basal-like	-	-	+
Indeterminado	-	-	-

Fig. 17

CK, Citoqueratina; EGFR, Factor de crecimiento epidérmico; RE, Receptor de estrógenos.

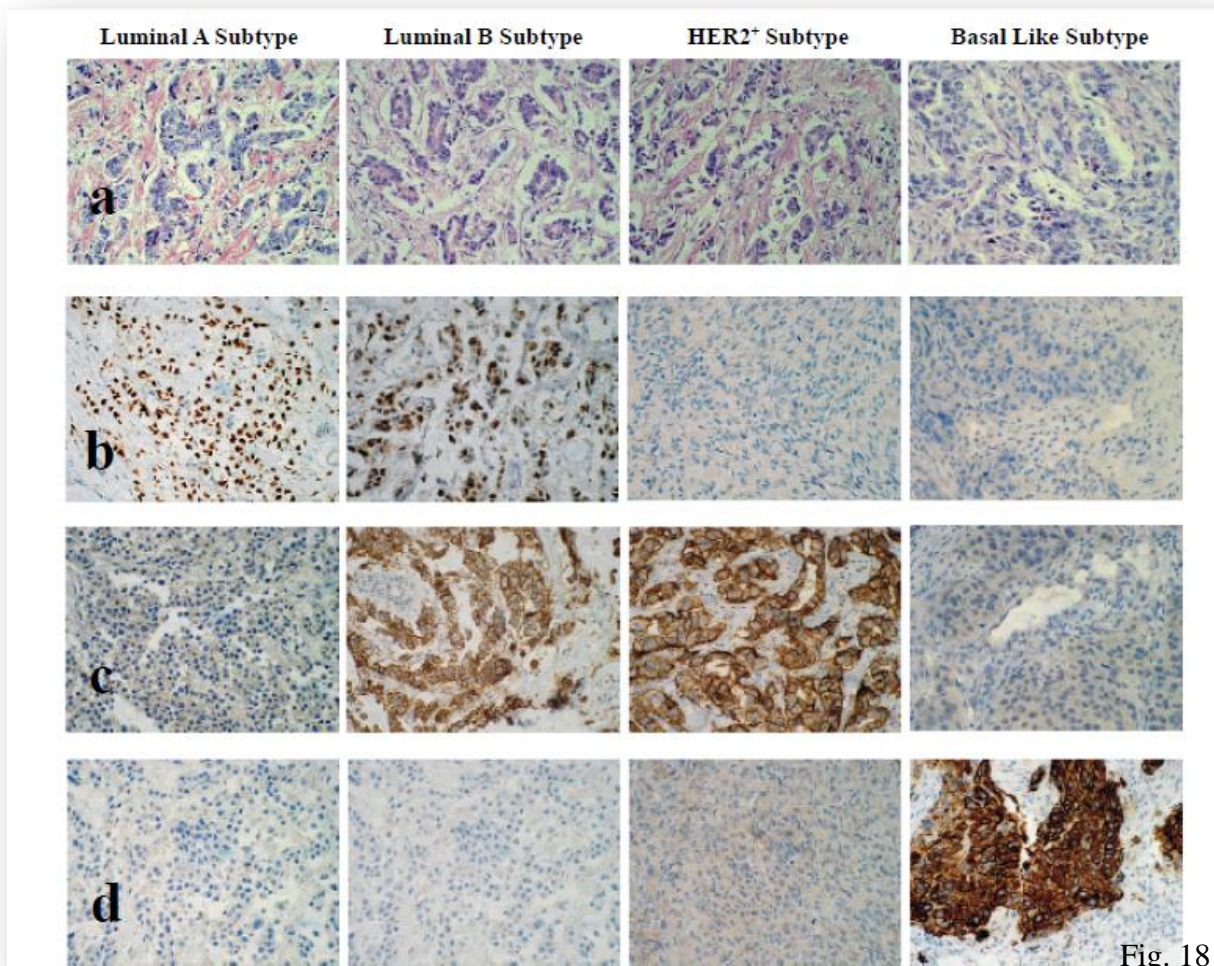


Fig. 18

Aunque aún no existe consenso internacional para elegir un panel de anticuerpos que permita establecer el diagnóstico definitivo de carcinomas mamarios con fenotipo basal-like, en numerosas publicaciones se ha propuesto varios paneles (228). En general, se ha demostrado que en aquellos tumores de fenotipo basal confirmados por “*microarrays*”, el panel de inmunohistoquímica tiene una sensibilidad del 76 % y una especificidad del 100 % (191).

La CK5/6 actualmente es considerada como el marcador basal más sensible (90,1%), seguido del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR1) (73,33%) y de la CK17 (61%) (191, 229, 230). Ésta última se caracteriza por relacionarse con una mayor tendencia al desarrollo de metástasis pulmonares y cerebrales, y con menor supervivencia (191,228).

Los carcinomas con fenotipo basal (triple negativo), presentan rasgos histológicos de agresividad (alto grado nuclear y elevado índice mitótico), así como ausencia de expresión de RE-, RP- y HER2-; y han sido asociados a resultados clínicos pobres y pronóstico peor (191).

Los tumores de tipo basal comparten características morfológicas, tales como necrosis tumoral focal, esclerosis y/o necrosis central, componente linfocitario abundante asociado, presencia de células tumorales fusiformes o células tumorales con diferenciación sarcomatoides, metaplasia escamosa y/o diferenciación escamosa, alto grado nuclear, alta tasa mitótica, elevada relación núcleo-citoplasma y patrón sincitial de las células tumorales (231,232).

1.10.CXCR4

Es bien sabido que el establecimiento de metástasis depende de las propiedades intrínsecas del tumor primario y de las características específicas del órgano diana. Destacamos la función de las quimiocinas y sus receptores, como biomarcadores predictivos asociados con metástasis de cáncer de mama; y su expresión en el tumor, los microvasos y en el parénquima del órgano diana (233). De hecho, la interacción de quimioquinas con sus receptores puede desempeñar un papel importante en las dos fases diferentes del proceso de metastatización. En primer lugar, en la migración de las células neoplásicas desde el foco primario al secundario. En segundo, en la progresión local de la metástasis mediante la inhibición del proceso de apoptosis y la inducción de la angiogénesis (234). Además, influyen en la infiltración linfocitaria estromal (235,236).

Las células tumorales producen receptores de quimioquinas que reconocen a ligandos homólogos (producido por ciertos órganos) y permiten la migración a lo largo de los gradientes de quimioquinas para el establecimiento de metástasis en órganos específicos. De todos los receptores de quimiocinas conocidos, las células del cáncer de mama expresan específicamente la CXCR4 y CCR7, siendo sus ligandos CXCL12 y CCL21 respectivamente (4).

Las quimiocinas pertenecen a la gran familia de citoquinas e inducen organización del citoesqueleto y migración endotelial y direccional de las células tumorales a través de su interacción con los receptores de proteína G acoplados (4).

Muller et al. defienden la hipótesis de que los órganos diana presentan aumento de expresión y que actúan como atrayentes específicos de células tumorales, de modo análogo a su función quimioatrayente de las células hematógenas durante el proceso inflamatorio (233,237).

Entre las quimiocinas destaca el receptor de CXCR4 - 4 quimiocina (CXCR4) y su único ligando, ligando quimiocina CXCR4 - 12 (CXCL12) (4, 238).

Las quimioquinas son proteínas pequeñas monoméricas de 8 a 15 kiloDalton, que se clasifican en función de la existencia y localización de los residuos de cisteína en cuatro subgrupos: CXC , CC , C , y CX3C (238).

Diversos estudios anteriores han documentado una participación e influencia directa del eje receptor /ligando CXCL12 - CXCR4 sobre la vía de señalización PI3K/Akt y ERK, y en los procesos de disociación, la invasión de la matriz, adhesión, transporte y migración celular (238-241).

La tinción de CXCR4 en las células tumorales es citoplásmica y/o nuclear o de membrana (Figura 19). La evaluación de la tinción se realiza en base a dos parámetros, tinción citoplasmática y nuclear.

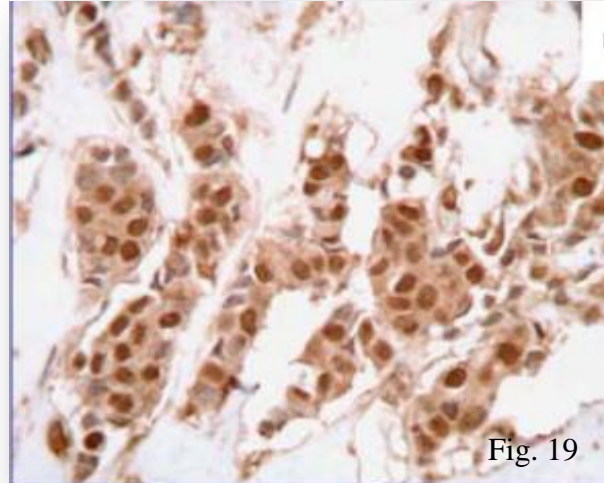


Fig. 19

La intensidad citoplásmica se evalúa del siguiente modo: (0) ausencia; (1 +) debil, (2+) moderado, y (3 +) fuerte. Se consideran como positivos, los casos con puntuación 2 o 3; y negativos, aquellos con puntuación 0 o 1. De acuerdo a la tinción nuclear, ésta es catalogada como positiva (1) y como negativa (0) (4).

Kang et al. definen una firma genética, que relaciona la sobreexpresión de IL - 11, MMP - 1 y CXCR4 en las células tumorales de cáncer de mama con metástasis en hueso (7). Por otra parte, CXCR4 ha sido significativamente expresado en células tumorales de cáncer de mama con ganglios linfáticos positivos para metástasis y su ligando CXCL12 se expresan más en tumores metastásicos que en tumores primarios del mismo paciente (4).

La expresión de CXCR4 en tumores primarios ha sido asociada con un mayor riesgo para el posterior desarrollo de metástasis óseas (Figura 20) (242).

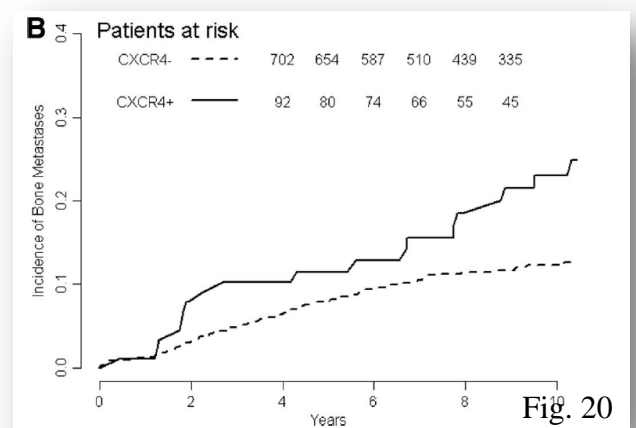


Fig. 20

La expresión de CXCR4, y otros biomarcadores como CCR7 y EGFR, se asocian con metástasis de ganglios linfáticos y se consideran indicadores de mal pronóstico (4).

CXCR4 es expresado intensamente en las células neoplásicas de cáncer de mama en humano y en sus metástasis tumorales. Mientras que su ligando CXCL12 se expresa preferentemente en los tumores de pulmón, hígado, médula ósea y ganglios. Por lo tanto, se deduce que el eje CXCL12 - CXCR4 puede estar asociado con la metástasis pulmonares, hepáticas, óseas y cerebrales (4,243).

Informes recientes sugieren que la expresión de CXCR4 puede estar regulada o influenciada por la amplificación de HER2 /neu (4), ya que su expresión se asocia fuertemente con factores de crecimiento (EGFR y HER2/neu) (4).

La expresión de CXCR4 ha sido identificada como factor predictivo de peor pronóstico en tumores metastásicos y también en tumores malignos de origen neural, como el glioma (236) y el neuroblastoma (244).

De la misma manera, los receptores de quimioquinas / quimiocinas se han relacionado directamente con el activado de las células endoteliales linfáticas (LEC) y linfangiogénesis del tumor (238).

La sobreexpresión elevada de CXCR4 en el cáncer de mama predice una evolución peor en los pacientes que tienen cáncer de mama triple negativo (245).

Estudios actuales han confirmando la relación entre CXCR4, MMP-9 y VEGF, y la existencia de metástasis en ganglios linfáticos en el cáncer de mama y explican cómo la expresión combinada de los tres presenta una fuerte y firme asociación con la metástasis ganglionares (246).

A pesar de haber sido registrado y considerado como válido un marcaje indistinto citoplasmático, nuclear o de membrana de las células tumorales; la heterogeneidad que en sí mismo presenta el tumor de mama y los distintos patrones de tinción han sido objeto de numerosos estudios.

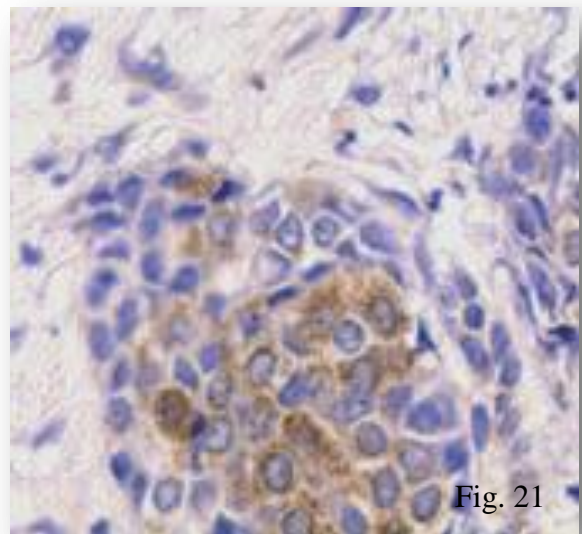
La alta expresión de CXCR4 a nivel nuclear y/o citoplasmática está directamente relacionada con un peor pronóstico, menor período libre de enfermedad y menor supervivencia global (4).

Diversos estudios han demostrado que el proceso metastásico es diferente en el cáncer de mama según presente ganglios negativos o positivos para metástasis (247).

En el cáncer de mama con ganglios negativos sugieren que la expresión de membrana de CXCR4 parece desempeñar un papel clave en la invasión vascular de las células tumorales, mientras que posiblemente sea importante pero no esencial durante la invasión linfática (247).

La alta expresión nuclear de CXCR4 ha sido detectada en cánceres de mama invasivos, correlacionándola directamente con el grado de progresión tumoral (237). La expresión citoplasmática se ha relacionado con rasgos de agresividad tumoral, como receptores hormonales negativos y HER2 sobreexpresado y amplificado (237), y con metástasis en los ganglios linfáticos (4).

La literatura defiende y relaciona una alta expresión citoplasmática de CXCR4 (Figura 21) en cánceres de células no pequeñas, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama y carcinoma de células escamosas orales, nasofaríngeo y esofágico, así como en el carcinoma hepatocelular (248-252), y también ha demostrado que los pacientes con alta expresión de CXCR4 tienen un período más corto de supervivencia. Es decir, existe relación directa entre la intensidad de la tinción y el mal pronóstico (245).



Así pues, todo parece indicar que la molécula CXCR4 es un marcador de invasión en el cáncer de mama, y la expresión alta se asocia a progresión tumoral, de tal modo que existe relación directa entre intensidad de tinción y grado de invasión tumoral (237).

No obstante, Andre et al. (242) han mostrado resultados contradictorios. En un estudio de 200 cánceres de mama, de los cuales 103 presentaban metástasis óseas, el 80 % (82 de 103) de la metástasis óseas se produjeron en pacientes con tumores CXCR4 negativo, siendo sólo el 20 % de los pacientes con metástasis óseas CXCR4 positivas.

Esta observación sugiere que la expresión de CXCR4 a nivel individual, puede no ser lo suficientemente precisa para ser considerado como un buen predictor independiente de las metástasis óseas. De tal modo que es necesario la coexistencia de otros biomarcadores que complementen el resultado de la expresión de CXCR4 para el desarrollo de metástasis óseas.

Smid et al. (11) identificaron un grupo de 31 genes como predictores principales de metástasis ósea en el carcinoma de mama. Entre ellos Kang et al. (7) destacan como más importantes la IL-11, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), y factor de crecimiento transformante (TGF), y posiblemente también el CXCR4.

Estos datos sugieren que a pesar de que la expresión de CXCR4 se asocia con una mayor tasa de metástasis ósea, es necesaria la presencia de otros biomarcadores complementarios para poder predecir con mayor precisión la aparición de metástasis óseas (242).

La expresión de los receptores de quimioquinas puede servir como herramienta para guiar la toma de decisiones terapéuticas (3), y pueden ser útiles en la identificación de nuevas vías en la terapia del cáncer de mama (4).

1.11.Fascina

En el citoesqueleto de la célula tumoral la actina desempeña un papel importante ya que está involucrado en diversos aspectos del desarrollo del cáncer y su progresión (253). Esta situación ha sido relacionada con una sobreproducción de proteasas que reducen la capacidad de adhesión célula-célula y provocan cambios en la actina (254-257), y expresión de una proteína no presente en el epitelio normal, como es la Fascina (258).

La Fascina es una proteína de unión a la actina, formada por una secuencia de 493 aminoácidos y 55 KDa., que pertenece a la familia de las proteínas pliegue beta-trébol y tiene una estructura con 4 dominios de unión.

A diferencia de la fascina registrada en los insectos, que sólo presenta una única isoforma; en los seres humanos se demuestra la existencia de 3 tipos de fascina diferentes; siendo la fascina-1 o Fascina, la protagonista de nuestro capítulo (259). El gen cuya codificación da lugar a la fascina-1 se encuentra en el cromosoma 7p22.

La Fascina contiene dos sitios de unión a la actina, ubicados en el extremo N- y C- terminal de la proteína, facilitando la agrupación efectiva entre la fascina y los filamentos de actina (260). El primero de los sitios de unión se encuentra entre los aminoácidos 33-47, y el segundo entre los aminoácidos 277-493 (Figura 22).

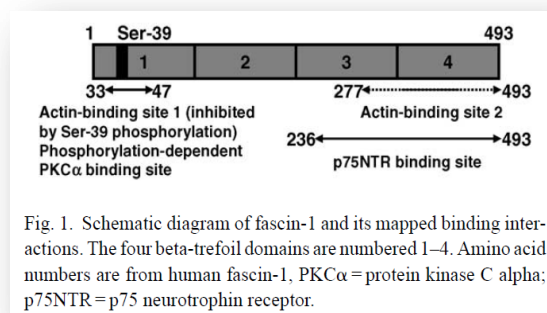


Fig. 1. Schematic diagram of fascin-1 and its mapped binding interactions. The four beta-trefoil domains are numbered 1-4. Amino acid numbers are from human fascin-1. PKCα = protein kinase C alpha; p75NTR = p75 neurotrophin receptor.

Fig. 22

Dentro del sitio de unión de la fascina con la actina, localizado en el extremo amino, se encuentra el segmento ser-39, cuya activación inhibe la capacidad de unión fascina-actina, formándose agrupaciones digitiformes de actina, con un papel importante en la migración celular.

La Fascina se expresa en la embriogénesis, participando en el desarrollo del sistema nervioso y las extremidades (261). Una vez concluido el desarrollo, los niveles de fascina disminuyen y prácticamente desaparecen en el tejido adulto, de manera que los epitelios normales y maduros del conducto biliar, mama, colon, ovario, páncreas y estómago carecen de expresión. En cambio, es de señalar que en el adulto existe expresión fisiológica de fascina en las células endoteliales vasculares, neuronales, y en los fibroblastos (262,263).

En condiciones no tumorales, las células epiteliales de los seres humanos presentan una ausencia o baja expresión de Fascina. Ésta comienza a presentarse progresivamente en el desarrollo tumoral siendo su expresión máxima en los carcinomas invasivos más desarrollados. Estos hechos han sido confirmados en numerosos estudios recientes, que demostraron un alto nivel de fascina en carcinomas de mama, páncreas, carcinoma no microcítico de pulmón, gástrico, colónico, piel, ovario y próstata (264-267).

El aumento de la expresión de fascina se ha relacionado con la existencia de mutaciones cromosómicas (amplificación de la región 7p22) y en las alteraciones transcripcionales y/o post-transcripcionales, y también con la acción de factores exógenos (Figura 23).

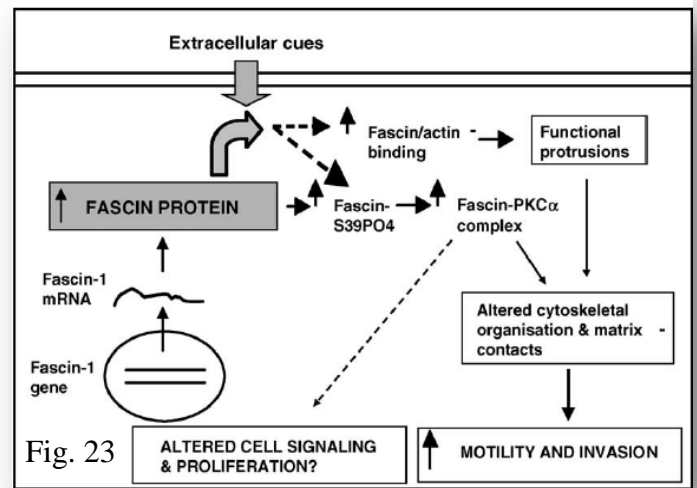


Fig. 23

En condiciones normales, la actina se une a la topomiosina, unión regulada por el caldesmón. La fascina, bloquea la unión actina-topomiosina, uniéndose ella misma a la actina (actina-fascina) y dando lugar a estructuras compuestas por haces paralelos de actina-F, que presentan una distancia de 8nm entre los filamentos (257).

Estos paquetes paralelos de actina-Fascina fortalecen el citoesqueleto de la célula tumoral y desarrollan el complejo Arp2/3, el cual induce a la polimerización de actina (fibras de estrés), permitiendo el desarrollo de redes de actina-fascina, con la formación en la membrana celular, de estructuras salientes de aspecto protuberante, conocidos como Filopodios (con forma digitiforme) y Lamellipodia (258,268) (Figura 24 y 25).

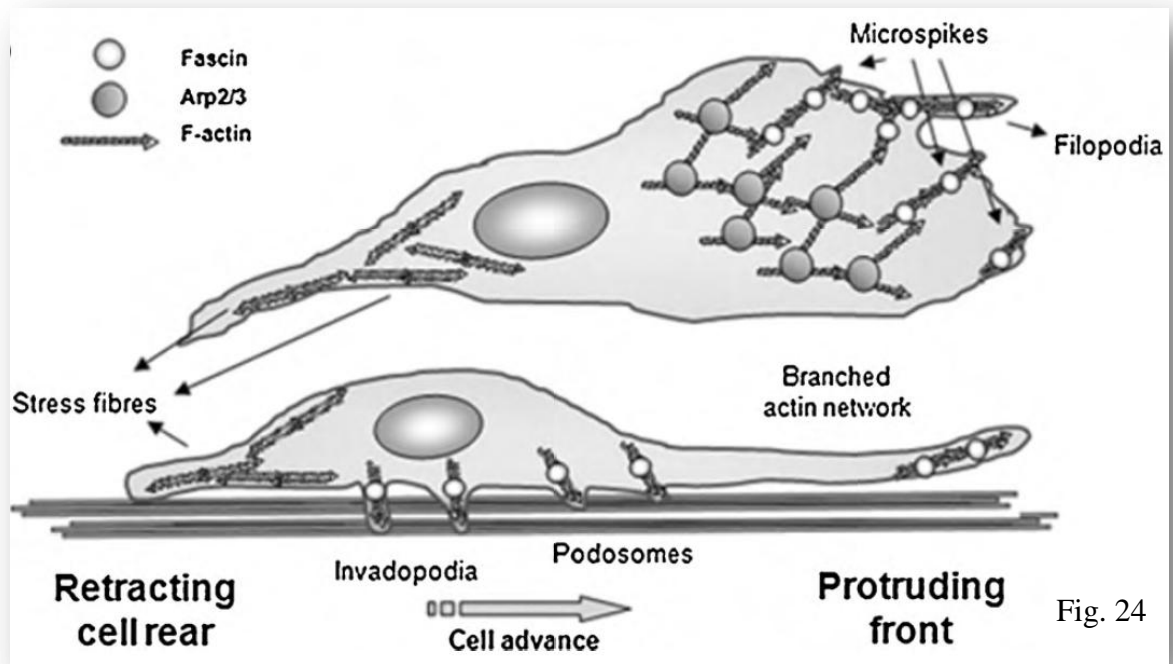


Fig. 24

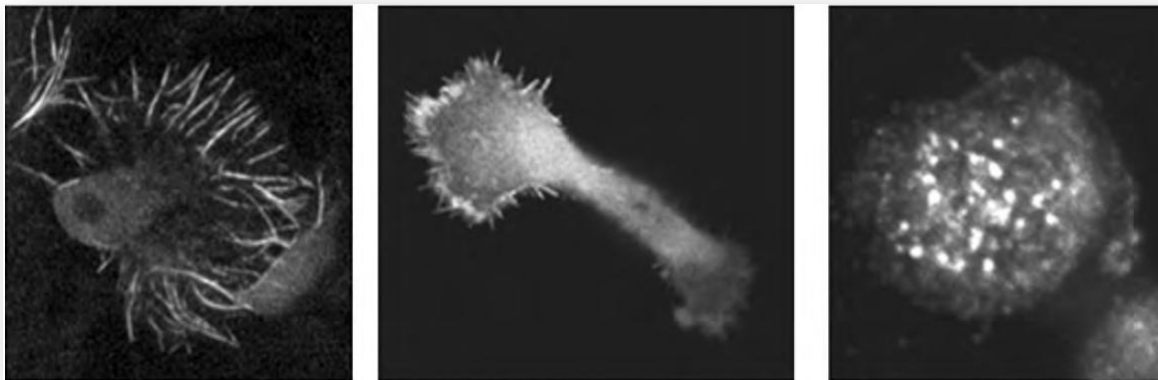


Fig. 25

Estas estructuras protuberantes crean unas fuerzas de tracción que induce al movimiento de la célula hacia adelante, promoviendo así el proceso de migración celular, estableciéndose una relación directa entre la expresión de fascina, la disminución de adhesión intercelular y la adquisición de la capacidad de migración celular a través de la membrana basal y el tejido adyacente (257).

Varios estudios han demostrado la existencia de correlación entre expresión de fascina en los carcinomas, y alto índice de proliferación celular (Ki67) (263,269). De tal modo, que la expresión de fascina, se asocia con tumores clínicamente agresivos en esófago y estómago (269,270) y con el carcinoma hepatocelular (271).

La expresión de fascina-1 en el tejido humano tumoral se estudia principalmente con el método por inmunohistoquímica, existiendo tinción más débil a nivel central, secundario a posibles áreas hipóxicas o necróticas; y mayor intensidad en la periferia; este patrón tintorial explica bien la propiedad de la proteína a inducir la migración celular (272). Su evaluación se lleva a cabo mediante la multiplicación de los valores de Intensidad y Porcentaje de expresión, obteniendo cifras comprendidas entre 0-12. Se considerará expresión negativa de 0-2, y expresión positiva, de 3-12.

En el cáncer de mama, la expresión de fascina se correlaciona con mal pronóstico, disminución del tiempo libre de enfermedad y disminución de la supervivencia global (273) (Figura 26, A y B), así como con el cáncer de mama fenotipo basal triple negativo (274).

Existe relación significativa en el cáncer gástrico y de mama, entre expresión alta de fascina y estadio patológico avanzado, ganglios positivos, y metástasis a distancia (270).

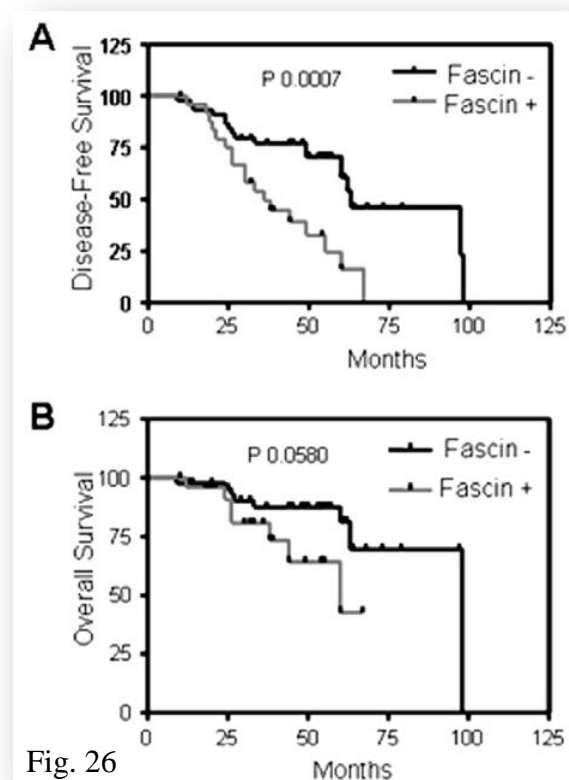


Fig. 26

En la actualidad, la Fascina es considerada como un marcador pronóstico importante en diversos tipos de tumores, entre los que destacamos el cáncer de mama; permitiendo la detección de tumores potencialmente más agresivos, permitiendo seleccionar tumores y pacientes más receptivos y sensibles a terapias específicas.

1.12.FOXA1

FOX es una familia de factores de transcripción que se compone de al menos 40 miembros. La subfamilia FOXA/HNF-3, regula la transcripción de numerosos genes en hepatocitos de hígado adulto (275, 276).

Dentro de esta subfamilia se reconocen tres factores diferentes: FOXA1/HNF3 α (factor nuclear de hepatocitos 3 α), FOXA2/HNF3 β y FOXA3/HNF3 γ .

La expresión de estos factores de transcripción se advierte especialmente en mama, hígado, páncreas, vejiga, próstata, colon y pulmón y pueden unirse a promotores de más de cien genes asociados con la regulación de la señalización celular y el ciclo celular (277-282). FOXA1, en particular, desempeña un papel importante en páncreas, riñón, hígado, pulmón, tracto gastro-intestinal, cerebro, próstata y glándula mamaria (275,277).

FOXA2 es el primer factor de transcripción del grupo en expresarse. Se observa durante la embriogénesis. La expresión de FOXA1 se detecta en la etapa tardía de la embriogénesis, en la línea media del endodermo, seguido de la expresión en la placa del piso ventral, notocorda y el intestino. FOXA3 es el último factor de transcripción en ser activado, advirtiéndose en el intestino su posterior diferenciación (275).

FOXA presenta una estructura conservada, en forma de hélice, que consiste en un dominio de unión a ADN similar al que presentan las histonas (275) y 4 regiones de transactivación, 2 en el lado C-terminal de la proteína y 2 en su extremo N-terminal (278-280).

Entre las múltiples funciones generales de FOXA1 destacamos su capacidad para configurar la cromatina, permitiendo el desarrollo de otros reguladores transcripcionales (281-283); la participación en el proceso de diferenciación de las células pluripotenciales P19 (284), el cual viene precedido por la unión de FOXA1 a ADN; así como la posterior pérdida de la metilación de citosina y la desmetilación de la histona H3 lisina K4 (H3K4) (275) (Figura27).

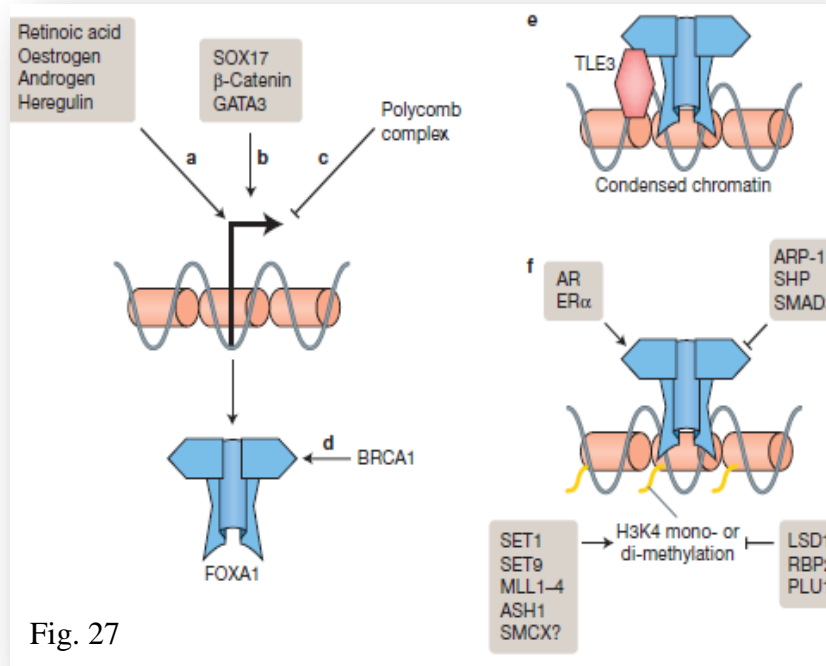


Fig. 27

La capacidad de remodelación de la heterocromatina que presenta FOXA1 la involucran en un proceso de transcripción que influye en el ciclo celular y en el desarrollo de la enfermedad.

FOXA1 se requiere para el desarrollo normal de la mama y glándula prostática, y es necesaria para el desarrollo de los receptores de estrógenos y andrógenos (275). A su vez, su ausencia, ha sido relacionada con hipoglucemia grave y deshidratación.

La expresión de FOXA1 en el cáncer de mama se correlaciona positivamente con la expresión de ER y con otros factores de transcripción, entre los que destacamos el GATA3 (285,286). Ambos son mediadores necesarios para el desarrollo normal de la glándula mamaria (287). No obstante, Kouros-Mehr et al. (287) han demostrado que la expresión de GATA3 no influye en la expresión de FOXA1 y por lo tanto, es prescindible para la expresión de FOXA1 en la glándula mamaria.

En cambio, demostraron que en carcinomas en otras localizaciones existe unión GATA3 al promotor FoxA1 (287), dejando así abierta la posibilidad que presenta a GATA3 como posible regulador de la expresión de FOXA1 en otros tipos de tejidos diferentes al mamario (275).

La correlación existente entre FOXA1 y RE en cáncer de mama parece indicar que FOXA1 desempeña un papel esencial en la regulación transcripcional de RE. En apoyo a esta hipótesis, FOXA1 y RE son co-expresados en el epitelio luminal de la glándula mamaria durante el desarrollo (275,288).

A diferencia del cáncer de próstata, donde la pérdida de FOXA1 afecta a la expresión de los receptores hormonales afines pero se conserva su expresión; en el cáncer de mama, la pérdida de la expresión de FOXA1, se asocia a pérdida de expresión epitelial de RE (275).

En glándulas mamarias deficientes de RE se mantiene la expresión de FOXA1 y GATA3 (288). Esto contrasta con lo que se observa en glándulas mamarias deficientes de GATA3 donde se mantiene la expresión de FOXA1 (288), pero se pierde la RE. Así pues, existe un orden jerárquico de estos tres factores de transcripción que sitúa a GATA-3 y FOXA1 en un nivel superior a RE; revelándose también cómo la expresión de GATA-3 y FOXA1 no son interdependientes.

Curiosamente, a diferencia de los defectos observados en páncreas, pulmón, intestino y próstata, secundarios a la ausencia o falta de expresión de FOXA1, la pérdida de este factor de transcripción en la glándula mamaria no afecta a la maduración lobulo-alveolar y la producción de leche (288).

El papel de FOXA1 en la carcinogénesis se ha estudiado especialmente en el carcinoma de mama; donde parece existir relación entre agresividad histológica y la expresión de este factor de transcripción y subtipo molecular.

Los subtipos moleculares de cáncer de mama se distinguen por la expresión diferencial de numerosos genes. En particular, el FOXA1 se expresa en tumores subtipo luminal, junto con varios otros genes discriminatorios, incluidos ESR1 y GATA3.

Diversos estudios anteriores han confirmado una frecuencia de FOXA1 positivo del 42 y el 77% en los tumores subtipo luminal A (279,285, 289,290,291).

Desde que se descubrió la relación de FOXA1 y su presencia en los tumores subtipo luminales, ésta se ha convertido en una molécula de gran interés.

Varios grupos de investigación han propuesto utilizar FOXA1 como herramienta pronóstica para estadificar a los pacientes en el subtipo luminal con RE-positivo. Los resultados de estos estudios sugieren que FOXA1 puede predecir la supervivencia en esta población, y por lo tanto ayudar en la toma de decisiones terapéuticas.

Hannenhalli et al. (275) investigaron la correlación entre la expresión de FOXA1 y Oncotype DX en pacientes con enfermedad con ganglios negativos y RE-positivo. Se observó expresión negativa de FOXA1 ante indicaciones de Oncotype de recurrencia.

Esta idea llevó a los autores a sugerir cómo la expresión de FOXA1 podría resultar un método más rentable y práctico que el Oncotype DX para el estadiaje de tumores de mama RE positivos.

Aunque FOXA1 se correlaciona estadísticamente con RE, diversos estudios han registrado expresión de FOXA1 en tumores RE negativos. Por otro lado, también se ha señalado que FOXA1/Receptores de andrógenos positivos inducen a la transcripción de un conjunto de genes que transmiten el fenotipo de cánceres de mama apocrino (275).

Podemos concluir que FOXA1 es necesario para el crecimiento celular y específicamente para la progresión del ciclo celular mediada por estrógenos. La unión de FOXA1 generalmente disminuye con el tratamiento antiestrógenos.

Además de la capacidad del FOXA1 para controlar la actividad de RE, se han descrito otras funciones, tales como supervivencia celular HER2-inducida y la expresión de la molécula de adhesión de célula a célula, E-cadherina, con la consecuente disminución de la capacidad migratoria de estas células, lo que sugiere que FOXA1 puede promover su diferenciación y actúa como un factor de protección frente al cáncer de mama.

En el cáncer de mama la expresión FOXA1 se asocia con un grado histológico bajo, menor recuento mitótico, menor tamaño tumoral (289) y expresión positiva de receptores hormonales (RE, RPG y RA), y otros marcadores luminales que sugieren su asociación con el bajo grado nuclear.

La sobreexpresión de FOXA1, se ha relacionado con un buen pronóstico, mayor supervivencia y mayor período libre de enfermedad, y menor frecuencia de metástasis a distancia (277).

La expresión de FOXA1 puede ser un marcador útil para el cáncer de mama RE positivo/HER2-negativo en la identificación de los pacientes con buen pronóstico que no requieren tratamiento neoadyuvante (292). Por lo tanto, es un biomarcador necesario para ayudar a identificar a los pacientes con cáncer de mama RE-positivo / HER2-negativos que hacen necesario la neoadyuvancia (292).

Además de en el cáncer de mama, la expresión de FOXA1 ha sido estudiada en varios cánceres humanos, donde se ha confirmado una función estimuladora o supresora en función del tipo y la localización (275). El gen FOXA1 se amplifica en carcinomas anaplásico de tiroides, y en un subconjunto de tipos de cáncer de esófago y pulmón.

La valoración de la expresión de FOXA1 en inmunohistoquímica se basa en la cuantificación de dos parámetros. Porcentaje de células neoplásicas teñidas; observándose una tinción nuclear de las células neoplásicas, sin evidencias de tinción de membrana o citoplasmática, y detectándose expresión en las células neoplásicas y también en algunas células ductales epiteliales de tejido mamario normal. Este porcentaje es representado por una variable numérica comprendida entre 0-10, en función del porcentaje de expresión de las células tumorales.

El segundo parámetro estudiado es la intensidad, confiriéndole a ésta valores entre 0, 1, 2 o 3, según ausencia de tinción, débil, moderada o intensa. Posteriormente ambos valores numéricos se multiplican dando como producto final un valor comprendido entre 0-30.

Se considerará expresión baja los valores entre 0-3; y alta los comprendidos entre 4-30 (293). Los valores superiores a 3 se relacionan directamente con un mejor pronóstico y mayor supervivencia (Figura 28).

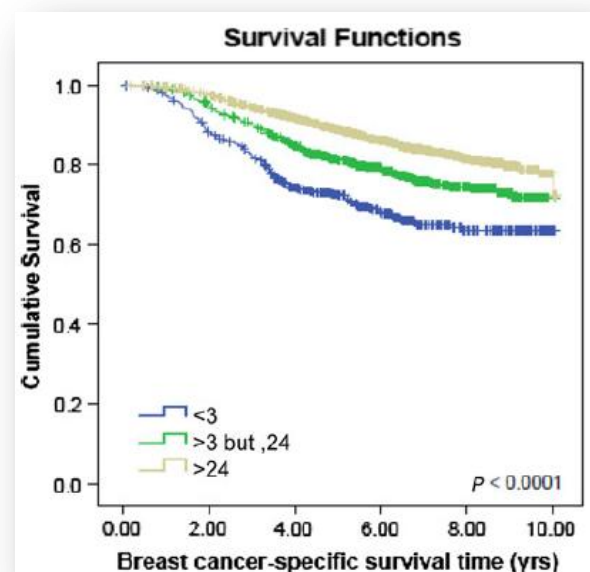


Fig. 28

Resumiendo, diversos estudios han confirmado cómo la expresión positiva de FOXA1 se asocia con receptores de hormonas esteroideas (ERA, RPG y RA), buen pronóstico, menor tamaño tumoral, menor grado histológico, citoqueratinas luminales (CK18 y CK7 / 8), BRCA1 y E-cadherina. Su expresión mostró una relación inversa con citoqueratinas basales (CK14 y CK5 / 6) y P-cadherina; así como una correlación inversa con el grado nuclear y el índice de Ki67 (292).

Se encontró asociación entre la expresión elevada de FOXA y una mejor supervivencia (277).

La expresión de FOXA1 puede disminuir a medida que el cáncer progresa. Por lo tanto, los esfuerzos futuros deben centrarse en las pruebas que confirmen si la ausencia de expresión de FOXA1 en el cáncer es indicativa del tipo de origen y/o de un aumento progresivo de la actividad (294).

1.13.HER2

El HER2 es una proteína transmembrana de la familia de los receptores de crecimiento epidérmico epitelial, con actividad tirosín quinasa y favorece el desarrollo celular en una gran variedad de lesiones neoplásicas.

Histológicamente, los tumores que expresan HER2 son tumores de grado nuclear alto, poco diferenciados (295). Esta proteína se expresa aproximadamente en el 30% de los carcinomas de la glándula mamaria, y en concreto, en el 15-25% de los carcinomas invasivos de mama, asociando su sobreexpresión con un peor pronóstico (296-299).

Es considerado un marcador predictivo de la respuesta a la terapia endocrina (300,301); no observándose diferencias de beneficio entre el tamoxifeno y los inhibidores de aromataasa (302-304), que son ambos el tratamiento empleado en la actualidad.

El HER2, junto con otros biomarcadores como los receptores de estrógeno y progesterona, y el Ki67; forman parte de un perfil inmunohistoquímico que mide la sobreexpresión de la proteína HER2 (305).

Diversos estudios han confirmado la consideración de la amplificación de HER2 como un factor predictivo de la respuesta ante diversos fármacos citotóxicos, incluidos la antraciclina y el paclitaxel (296,306); éste último se ha relacionado concretamente con la respuesta y el efecto en pacientes con enfermedad metastásica (307). Por lo que se obtiene la idea principal de que el HER2, localizado en el cromosoma 17; puede ser un importante regulador de la capacidad de respuesta al tratamiento con antraciclina (296).

La amplificación del gen HER2 se ha identificado como indicador pronóstico del cáncer de mama, de tal modo que su sobreexpresión se relaciona con mayor riesgo de recidiva y una menor supervivencia global (302) (Figura 29). La amplificación del Gen HER2 y la sobreexpresión de la proteína HER2 se encuentran intensamente relacionadas (308).

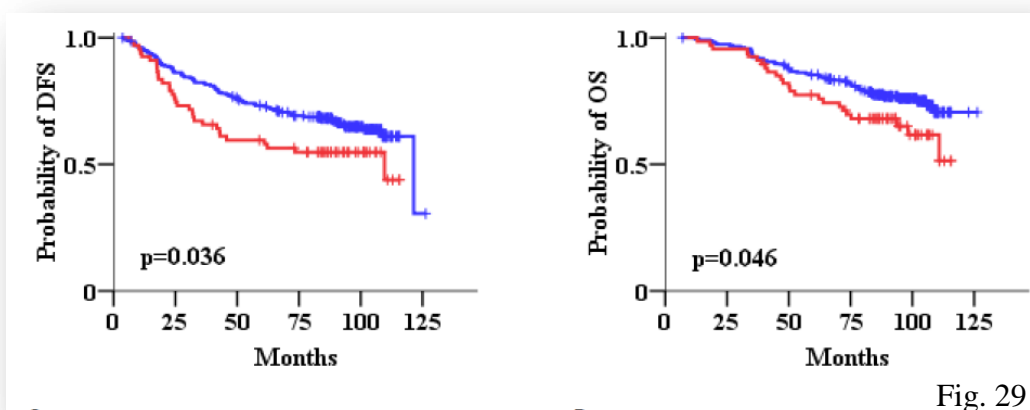


Fig. 29

De igual modo, Farzand et al. (309) realizaron un estudio de 50 adenocarcinomas de distintas localizaciones del sistema digestivo, y obtuvieron como resultado una sobreexpresión de la proteína HER2 en 33 (66%) de los pacientes estudiados ($P = 0,000$); siendo éstos en su mayoría carcinomas gástricos y de colon. Se identifica la amplificación de HER2 como indicador pronóstico del cáncer gástrico y se describe una asociación entre un mayor grado de agresividad biológica del tumor y la sobreexpresión de la proteína HER2 (309).

El desarrollo del anticuerpo monoclonal trastuzumab, conocido como Herceptin, actúa específicamente sobre el HER2.

El estado de HER2 se evalúa actualmente en la mayoría de los casos inicialmente por inmunohistoquímica presentando una característica tinción de membrana (Figura 30). En los casos no concluyentes, los niveles de expresión de proteínas HER2, y el número de copia del gen es calculado a través de técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) o hibridación in situ cromatina (CISH) (310).

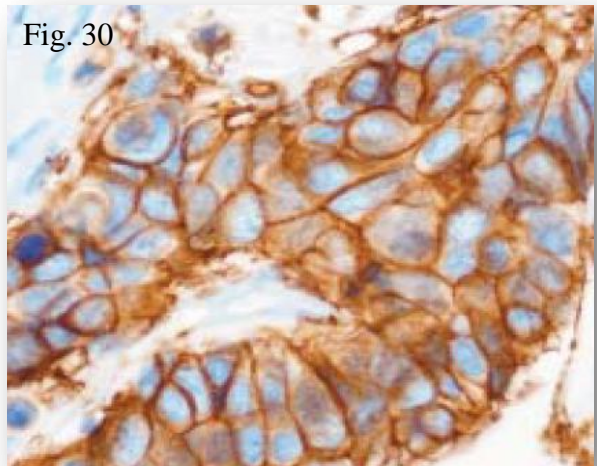


Fig. 30

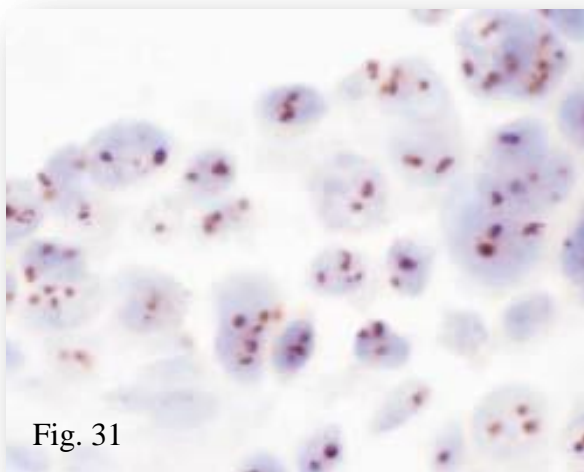


Fig. 31

Tanto FISH como CISH presentan resultados concordantes en tumores con alta amplificación de HER2 (Figura 31); mientras que los casos con amplificación baja producen resultados discordantes y confusos (296). Actualmente, los parámetros y la metodología óptima para la evaluación de HER2 no se encuentran bien definidos (299).

En el estudio Inmunohistoquímico se interpretan dos parámetros: el porcentaje de componente tumoral teñido y la intensidad de la tinción (mediante el uso de variables numérica, de 0 a 3). Ambos parámetros permiten obtener tres posibles resultados: negativo, indeterminado (no concluyente) y positivo (300,305).

En el año 2013 se realizó una revisión y actualización en el protocolo y normas de evaluación de los resultados con respecto a las normas de la guía original que se estableció en el año 2007.

El CAP ha modificado su programa de acreditación y ha incluido una evaluación más rigurosa y estricta de las pruebas de HER2. La causa principal de esta actualización ha sido la preocupación general que existía acerca de un porcentaje importante de pacientes con cáncer de mama con resultados de HER2 falsos positivos o negativos, y que según diversos estudios, son sobre o infratratados con terapias HER2; así como debido al vacío importante en la literatura en relación a los pacientes con resultados de la prueba HER2 2+ (equívoco).

Esta revisión ha sido destinada a mitigar los falsos negativos y positivos, particularmente en relación con los problemas de fijación de la muestra e interpretación de resultados.

Según la guía original del año 2007, el resultado HER2 positivo 3+ era otorgado sólo a aquellos casos con una tinción muy intensa de membrana expresada en más del 30% del componente tumoral infiltrante. En la revisión realizada en el año 2013, el resultado HER2 positivo 3+ se aplica a los casos que expresen tinción de membrana completa intensa y difusa en más del 10% de las células tumorales (311).

La tinción de membrana completa intensa en menos del 10% de las células tumorales infiltrantes, o incompleta débil o moderada, en más del 10%, se le adjudicará resultado inmunohistoquímico HER2 2+, considerado Equívoco o indeterminado. Esta situación se resuelve mediante la técnica de hibridación in situ (HIS) de DUAL-SISH que relaciona el número de copias de HER2 que se encuentran amplificadas en el cromosoma 17. La amplificación mediante HIS utilizando una sonda de doble señal (gen HER2 y cromosoma 17) está definida en primer lugar por el cociente HER2/CEP17 y, en segundo lugar por el número medio de copias de HER2 en el corte.

La técnica de HIS es positiva cuando la relación de HER/CEP17 es mayor o igual a 2, o cuando es menor a 2 pero el número medio de copias de HER2 por célula es mayor o igual a 6. De la misma manera, la técnica de HIS es negativa cuando la relación HER2/CEP17 es menor a 2 y el número medio de copias de HER2 por célula es menor a 4. Aquellos casos en el que la relación de HER2/CEP17 sea menor a 2 y el número medio de señales de HER2 por célula se encuentre comprendido entre 4 y 6, el resultado de la técnica de HIS es dudoso, y se debe solicitar una nueva determinación (311).

En el año 2007 el resultado HER2 negativo comprendía la expresión leve de membrana en un porcentaje inferior al 10% de las células tumorales (HER2 1+), o a la ausencia total de expresión (HER2 0). Sin embargo, la actualización del año 2013 considera HER2 1+ (Negativo) aquellos tumores con una tinción incompleta de membrana apenas perceptible que afecta a más del 10% de las células tumorales; y HER2 0-, a aquellos en los que el porcentaje de células tumorales infiltrantes con tinción incompleta y apenas perceptible no supera el 10% (311).

En resumen, la revisión y actualización de la Guía de Evaluación de resultados de HER2, defiende que debe realizarse la prueba de HER2 en tumores primarios, recurrentes y/o metastásicos. En base a la interpretación de resultados, ha limitado los casos en los que se adjudica directamente el resultado HER2 3+ (positivo) y han aumentado el porcentaje de resultados HER2 2+ (Indeterminado o Equívoco), que requieren completar el resultado con estudios de amplificación genómica, y HER2 negativo, reduciendo así el número de pacientes expuestos a recibir un resultado falso negativo o falso positivo (311).

Estudios recientes también describen una relación entre la amplificación de HER2 y la obtención de beneficios, con el uso de doxorrubicina como quimioterapia adyuvante (296,299), así como de paclitaxel.

El beneficio obtenido con antraciclinas parece presentarse de manera exclusiva en un subgrupo de tumores HER2 positivos, que presentan una co-amplificación del gen de la Topoisomerasa II (localizado también en el cromosoma 17, próximo al HER2) (312). Ambos están ubicados en distintos amplicones (299). La amplificación de topoisomerasa II se produce exclusivamente en presencia de la amplificación de HER2,

y estudios confirman cómo esta co-amplificación HER2/TOP2A ha sido descrita en un número significativo de tumores de mama (299).

La respuesta favorable asociada a esta co-amplificación, está en relación con el efecto inhibitorio que presentan las antraciclinas sobre la topoisomerasa II; bloqueando sus funciones en aquellos tumores que sobreexpresan HER2/TOP2A (313). No obstante, estudios más recientes, han aportado nuevas ideas que sugieren que los buenos y beneficiosos resultados obtenidos de la relación de HER2/TOP2A con antraciclinas, no se limitan a una causa de co-amplificación; sino que también pueden ser debidos a una polisomía del cromosoma 17 (314).

Entre los distintos tipos quimioterápicos, relacionados con la expresión de HER2, las antraciclinas y los taxanos se consideran los medicamentos esenciales, ya que han proporcionado un aumento notable de la eficacia del tratamiento y una mayor supervivencia. Sin embargo, se ha identificado una clara asociación entre administración de antraciclinas y aumento de la frecuencia de efectos secundarios adversos, incluyendo la toxicidad cardíaca, la cual es una causa importante de mortalidad. El efecto cardiotóxico depende de la dosis y del agente quimioterápico empleado, así como de la posible terapia combinada de quimio y radioterapia. La toxicidad cardiovascular es diferente según el agente quimioterápico empleado, y puede manifestarse mediante insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, arritmias, hipertensión, enfermedades valvulares o pericarditis y miocarditis (315). Diversos estudios han utilizado modelos con animales para la evaluación de la seguridad del medicamento y, en este sentido, Han Y. et al (316) han identificado edema pericárdico, bradicardia y finalmente muerte ante la exposición a un grupo de embriones de pez cebra a las antraciclinas. La doxorubicina se considera el agente con mayor efecto cardiotóxico dentro de las antraciclinas y la daunorrubicina, la de toxicidad menor.

En la actualidad, para poder utilizar la terapia con antraciclinas es necesario realizar previamente un estudio cardiovascular del paciente y administrar simultáneamente agentes cardioprotectores. Diversos estudios han identificado el papel importante que desarrolla el estrés oxidativo en el efecto tóxico de las antraciclinas; y presentan a los compuestos con propiedades antioxidantes como prometedor objeto de estudio (315).

1.14.Ki 67

Definido como el principal marcador del índice de proliferación celular, el Ki67 fue identificado por primera vez por Gerdes en la década de 1980 mediante la aplicación de un anticuerpo monoclonal contra un antígeno nuclear de una línea celular de linfoma de Hodgkin (302). La expresión de esta proteína nuclear, no histona, (Ki67) en células proliferantes y su ausencia en células quiescentes lo situaron como un excelente marcador de la proliferación celular.

Aunque la función de esta proteína en el ciclo celular no es bien conocida, diversos estudios han confirmado su expresión de manera constante en las fases G1, S y G2, presentando un pico en la fase de mitosis (M) y ausencia en la fase G0 (317).

Los niveles de expresión de la Ki67 se determinan en base al resultado cuantitativo, en forma de porcentaje de los núcleos de células tumorales teñidas positivamente. El proceso se lleva a cabo con el microscopio óptico y se considera un índice de Ki67 positivo cuando es superior al 10% (302).

La correlación de los biomarcadores y Ki67 en carcinoma de mama infiltrante ha sido intensamente estudiada; existiendo relación directa entre índice de proliferación y grado tumoral, presencia de ganglios positivos (318), supervivencia libre de enfermedad (319) y supervivencia global (302).

A pesar de las conclusiones obtenidas en los estudios anteriormente mencionados, actualmente, no se considera, ni se recomienda, como un marcador pronóstico individual para uso habitual el índice de Ki67, como sucede con los RE, RP y el HER2 (302).

Sin embargo, debemos considerar que la información aportada por el índice de Ki67 en el cáncer de mama es imprescindible (302). Concretamente, se ha mostrado útil para distinguir entre los tipos luminal A y luminal B, empleando como punto de corte un índice de proliferación de 13,25%; a partir del cual hablaríamos de Luminal B; siendo considerados con peor pronóstico éstos tumores de mayor puntuación (302).

Diversos estudios han relacionado también el índice Ki67 con la respuesta a la quimioterapia, de tal modo que niveles altos de Ki67 en fases previas al tratamiento, se asocian a una mayor respuesta y, en fases de postneoadyuvancia, con una mayor recurrencia (320).

En la actualidad, la importancia del índice de Ki67 en el cáncer de mama radica en su capacidad de predicción de un resultado, que aporta un mayor o menor beneficio para el paciente con tratamiento quimioterápico, combinando Tamoxifeno e Inhibidores de la aromatasas. Por lo tanto, se ha demostrado que una disminución de los niveles de Ki67 dos semanas después de aplicar el tratamiento con quimioterapia, se asocia a mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad, y un aumento después del tratamiento a una menor supervivencia y mayor riesgo de recidiva (302, 321).

1.15.p53

P53 es una proteína supresora de tumores codificada por el gen *TP53*. En situaciones de normalidad funciona como regulador de la actividad divisional, lo que le confiere el nombre de "el guardián del genoma" por su importante papel en la conservación de la estabilidad, mediante la prevención de las mutaciones del genoma.

Aunque fue identificado en 1979 por científicos de la Universidad de Princeton (Instituto del Cáncer de Nueva Jersey), su función como gen supresor de tumor no fue demostrado hasta 1989 por Bert Vogelstein.

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y la estructura de la proteína codificada difiere de vertebrados a invertebrados. En el ser humano contiene cinco regiones con alto grado de conservación en los vertebrados, particularmente los exones 2, 5, 6, 7 y 8.

La proteína P53 consta de 393 aminoácidos y siete dominios: Un dominio de activación, que se fija a factores de transcripción. Dos dominios complementarios de activación transcripcional, involucrados en la regulación de varios genes pro-apoptóticos. Un dominio de activación 2, seguido de otro de actividad apoptótica de p53, señalización nuclear y homo-oligomerización de dominio (OD) y, por último, un dominio central, implicado en la regulación negativa de unión al ADN.

Las mutaciones que desactivan P53 en el cáncer pueden afectar a cualquiera de los dominios, siendo las más frecuentes las que afectan al dominio DBD, que impide la activación transcripcional y las mutaciones en otros dominios como OD.

Además de la función reguladora del crecimiento, la P53 desempeña un papel importante en el desarrollo de la apoptosis, la estabilidad genómica, y la inhibición de la angiogénesis. Entre sus funciones destacamos: Activación de las proteínas de reparación del ADN cuando éste ha sufrido daños; inducción a la detención del ciclo celular en el punto de regulación G1 / S ante el reconocimiento de ADN dañado, permitiendo su reparación e impidiendo proliferación de células con ADN aberrante; e inducción de la apoptosis, ante daño irreparable de ADN.

En la célula normal, la proteína P53 se inactiva por su regulador negativo, MDM2 (también llamada HDM2 en los seres humanos), que es, en sí mismo, un producto inducido por la propia P53. El regulador se une a ésta, impidiendo su acción y

transportándola desde el núcleo al citosol. MDM2 también actúa como ubiquitina ligasa y une covalentemente ubiquitina a P53.

Ante un daño en el ADN u otros factores de estrés (UV, IR, agentes químicos, estrés oxidativo y choque osmótico entre otros), diversas vías conducen a la disociación del complejo de P53 y MDM2, liberando así a la P53 de su regulador negativo, y adquiriendo esta proteína un estado de activación, donde se produce un incremento de la vida media de la proteína p53, y un cambio conformacional de la misma, que inhibe su actividad quinasas y produce la fosforilación de su dominio N-terminal, alterando su capacidad de regulación de la transcripción en estas células.

Una vez activada, la P53 pone en marcha los diversos mecanismos, induciendo la detención del ciclo celular (mediante la formación del complejo WAF1/CIP1-CDK2 a través de la proteína p21, que le impide continuar a la siguiente etapa de la división celular) y permitir, así, la reparación y supervivencia de la célula o la inducción de la apoptosis si la célula está dañada.

Ante una mutación de la P53, la MDM2 no actúa y se produce su acumulación en el núcleo. La P53 alterada pierde su capacidad de unión al ADN y no se lleva a cabo la transcripción de la proteína P21, perdiéndose la "señal de parada" para la división celular, con un resultado de superproducción de células con ADN dañado.

Estudios recientes relacionan la P53 y la proteína RB, como importantes proteínas cuyas vías de activación a través de ARF presentan una gran importancia en el control del ciclo celular.

Ante la herencia de un gen *TP53* dañado, se reduce el control de la división celular y se facilita el desarrollo de tumores en la edad adulta temprana, dando lugar a la enfermedad conocida como el síndrome de Li-Fraumeni. En contraste, el aumento de activación de P53, lejos de presentar efectos beneficiosos, se ha relacionado con un envejecimiento prematuro.

Algunos estudios han demostrado que la expresión de RE, RP, HER2, Ki67 y P53 se correlacionan con el grado del tumor, en lugar de con la invasión (322,323).

Así pues, estudios que compararon los resultados inmunohistoquímicos en una serie de carcinomas in situ y en carcinomas infiltrante de mama de tipo no especial, encontraron una sobreexpresión de P53 en carcinomas infiltrantes de alto grado, relacionándolo con los subtipos moleculares HER2 y triple negativos (305); así como una disminución de su expresión o resultado negativo en carcinomas in situ, o en carcinomas infiltrantes de bajo grado, y los tipos Luminal A y Luminal B.

La expresión inmunohistoquímica de P53 en una extensión superior al 10% de las células tumorales se considera un signo de inactivación funcional (305). Estos niveles son superiores con mayor frecuencia en carcinomas infiltrantes de mama, en relación a los carcinomas in situ y en tumores de alto grado, frente a tumores de bajo grado con independencia de que sean in situ o infiltrantes (305).

Estos hallazgos obtenidos en diversos estudios, consolidan la posición de la P53, como uno de los componentes del panel de inmunohistoquímica básico en el cáncer de mama y, junto con el RE y el HER2, constituyen factores pronósticos importantes de esta enfermedad (305).

1.16.Receptor de Estrógenos

El receptor de estrógeno (RE) pertenece a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona 17β -estradiol. Se han descrito dos tipos de receptores de estrógeno: RE nuclear y el RE acoplado a proteínas G GPR30 (GPER).

El tipo de RE que vamos a considerar en este proyecto es el nuclear, cuya principal función es la de actuar como factor de transcripción de determinados genes.

Dentro de esta familia de RE nucleares, se distinguen dos tipos: α y β , ambos codificados por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2), situados en el cromosoma 6 (6q25.1) y en el cromosoma 14 (14q), respectivamente. Los receptores de estrógeno α y β presentan una secuencia similar y contienen cada uno siete dominios (324).

Ambos tipos de receptores, alfa y beta, se expresan en una amplia variedad de tejidos. El receptor RE α está presente principalmente en endometrio, tejido mamario, células del estroma ovárico e hipotálamo, y el RE β mayoritariamente en los riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmones, mucosa intestinal, próstata y células del endotelio.

Los RE, en ausencia de ligando, se localizan en el citoplasma, pero estudios recientes han identificado también una fracción nuclear.

La unión de la hormona al receptor pone en funcionamiento una secuencia de movimientos, que tienen como resultado final la migración del complejo desde el citoplasma al núcleo, la dimerización del receptor y la unión de éste a unas secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a hormonas.

El complejo receptor/ADN recluta otras proteínas implicadas en la transcripción de los genes diana, expresando así determinadas proteínas que darán lugar a variaciones en la función celular. Los receptores de estrógeno también tienen un dominio de unión a ADN y pueden actuar como factores de transcripción para regular la producción de proteínas.

Algunos de estos receptores pueden asociarse con otros (receptores tirosín quinasa y no tirosín quinasa) y formar complejos, como por ejemplo EGFR e IGF-1 y Src. A través de los receptores tirosina quinasa, las señales se transmiten al núcleo por la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT.

Los RE se sobreexpresan en el 70% de los casos de cáncer de mama. Estos tumores se conocen bajo el nombre de tumores "RE positivos". Se han propuesto dos mecanismos para explicar la relación entre expresión de RE y tumorigénesis.

Por un lado, la unión de estrógeno a su receptor induce la proliferación de las células de las glándulas mamarias a través del estímulo de la división celular, con replicación del ADN y el consiguiente riesgo de sufrir mutaciones. Por otro, el metabolismo del estrógeno produce residuos genotóxicos, que se depositan y acumulan, induciendo a un estrés celular, que al superar la capacidad autoconservadora de la célula, acaba originando células neoplásicas.

El resultado de ambos procesos es el bloqueo de la apoptosis y de la reparación del ADN, con la consecuente posibilidad del inicio de formación de un tumor.

Respecto al tratamiento, la terapia endocrina requiere el uso de moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), que se comportan como antagonistas de los RE en el tejido mamario, o bien inhibidores de aromatasa. El estatus de RE se utiliza para determinar la sensibilidad del cáncer de mama al Tamoxifeno y a los inhibidores de aromatasa (IA).

Los estrógenos y sus receptores también se encuentran implicados en cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de endometrio.

En la actualidad se emplea la inmunohistoquímica para la detección de receptores nucleares de hormonas. Su expresión guarda relación con una mejor evolución, además de ser considerado como indicador importante de respuesta al tratamiento hormonal.

Desde hace mucho tiempo, se sabe que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. La mayoría de los carcinomas son positivos para receptores de estrógenos (RE) y su firma genética está representada por expresión de genes relacionadas con los estrógenos (Tipo Luminal A y B). La mayoría de los tumores negativos para RE pertenecen a un grupo definido, conocido como tipo basal (Figura 32).

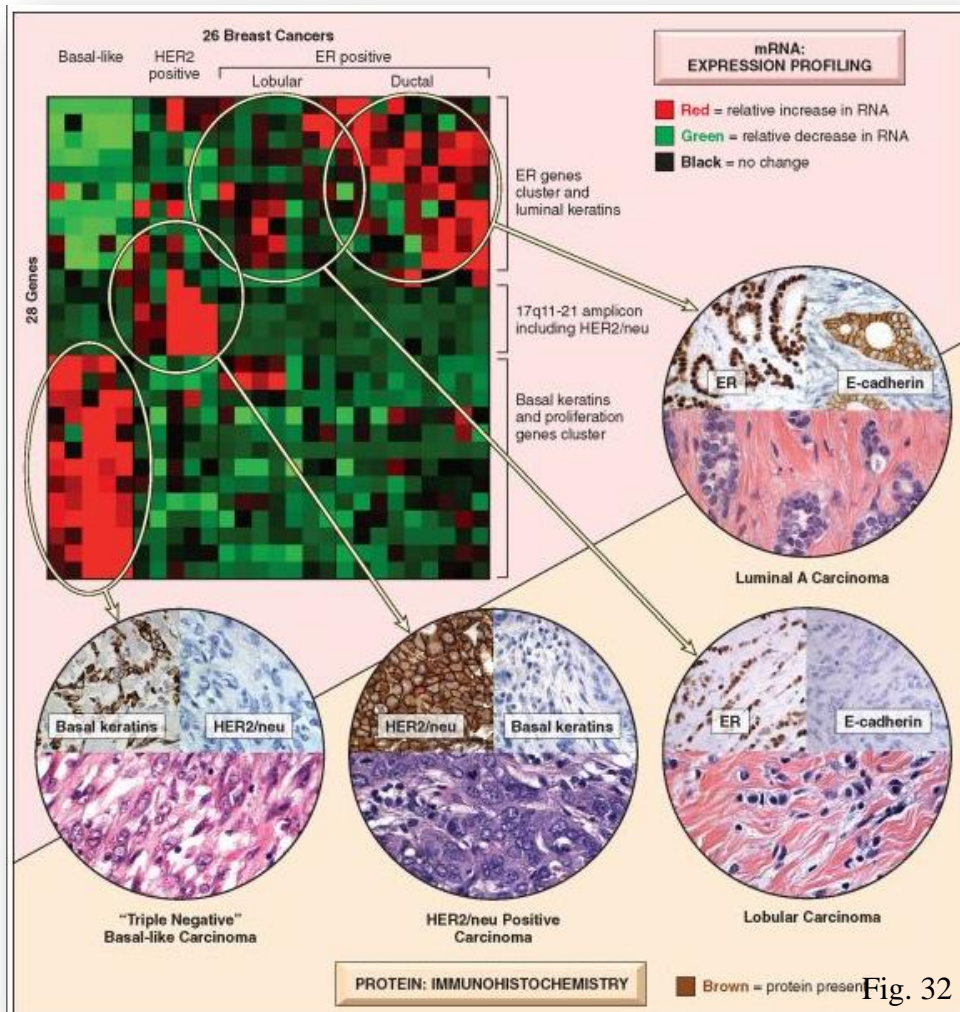


Fig. 32

Los carcinomas de mama RE positivos y RE negativos presentan diferencias notables, respecto a sus características clínicas y anatomopatológicas, que influyen en la respuesta al tratamiento y en su evolución. Los cánceres RE positivos responden mejor a la terapia endocrina y peor al tratamiento con quimioterapia. Por el contrario, los RE negativos tienen una probabilidad inferior al 10% de responder al tratamiento hormonal, pero, en cambio, presentan una respuesta mejor a la quimioterapia.

La incidencia de cáncer invasivo RE positivo ha disminuido en los últimos años, por razones multifactoriales, entre las que destaca la disminución en el uso de tratamiento hormonal sustitutivo postmenopáusico (325), ya que se considera que éstos estimulan el crecimiento de los carcinomas RE positivos.

Diversos estudios han confirmado una disminución de la tasa de mortalidad en pacientes con cáncer de mama RE-positivos tratados con tratamiento endocrino y una ausencia total de beneficios en los casos RE-negativos tratados con Tamoxifeno durante

5 años (326). El beneficio aportado es mayor en aquellos tumores con niveles de expresión cuantitativamente mayores (302, 326, 327).

En relación a una posible diferencia en cuanto al tipo de tratamiento endocrino (inhibidores de aromatasa vs. tamoxifeno) en tumores RE+, no han mostrado diferencias significativas (303,328).

Los RE también se han relacionado con la predicción de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Múltiples estudios clínicos han demostrado que pacientes con tumores RE-negativos, tratados con quimioterapia, presentan mayor probabilidad de alcanzar una respuesta completa, que otros que presentan tumores RE-positivos.

De manera que relacionamos RE-positivos con una mejor respuesta al tratamiento hormonal, y RE-negativo, con una respuesta más efectiva al tratamiento quimioterápico (329).

Una posible explicación a estas observaciones radica en el hecho de que la expresión elevada de RE se relaciona con la amplificación del gen ESR1 (330). No obstante, en el 3% de los carcinomas invasivos existe amplificación del gen en ausencia de sobreexpresión normal (331, 332).

La guía de la Sociedad Americana de Clínica Oncológica (ASCO) para el tratado del cáncer de mama, recomienda solicitar y valorar el resultado de RE en todos los casos de cáncer de mama en el momento del diagnóstico, así como en cualquier recidiva local o a distancia (302,305).

1.17.Receptor de Progesterona

El receptor de progesterona (RP) también conocido como NR3C3 (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 3), es un tipo de receptor esteroideo caracterizado por unirse específicamente a la progesterona.

En los seres humanos, el RP es codificado por el gen *PGR*, que se localiza en el cromosoma 11q22.

Los antagonistas del RP actúan como antiprogestágenos y su principal representante es la mifepristona.

La progesterona participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos en los mamíferos y su respuesta biológica está mediada por dos isoformas, denominadas RP-A y RP-B. Ambas están codificadas por el mismo gen, pero reguladas por distintos promotores y bajo la acción de los estrógenos.

La diferencia entre ambos tipos de receptores descansa en la secuencia de aminoácidos. La RP-B contiene un tramo de 164 aminoácidos en región amino-terminal que no está presente en RP-A. RP-B actúa como fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares mientras que RP-A funciona como inhibidor (333).

Diversos estudios han demostrado que los carcinomas de mama RE positivos y RP positivos, tienen mejor pronóstico y mejor respuesta al tratamiento hormonal, existiendo una correlación inversamente proporcional entre expresión de RE y RP y el grado histológico tumoral (305).

Además del papel pronóstico y predictivo de los RP en el cáncer de mama, los RP son uno de los biomarcadores que, junto a otros como RE, HER2, y Ki67, conforman el perfil inmunohistoquímico que permite la subtipificación de las variantes moleculares del carcinoma de mama invasivo (302,305).

La expresión del gen *PGR* es dependiente, y se encuentra estrechamente relacionado con la presencia del receptor de estrógenos. La mayoría de los carcinomas RP positivos, son RE positivos, siendo muy raros (< 1%) aquellos en que existe expresión de RP en ausencia de RE (303). Por lo que, se aconseja repetir la prueba inmunohistoquímica para los receptores de estrógeno si esto sucede, ya que los tumores RP+/RE- tienen una respuesta más limitada al Tamoxifeno, que los tumores RP+/RE+. No obstante, la terapia hormonal sigue siendo la mejor opción en tumores RP+/RE- (334).

En resumen, en la actualidad los RP se solicitan en cualquier cáncer de mama, ya que su sobreexpresión se asocia a una mejor respuesta ante terapia endocrina. Este biomarcador se considera uno de los factores pronósticos más importantes es la estimación del riesgo de recidiva en el cáncer de mama (302, 303, 334).

1.18.RKIP

El Inhibidor de la RAF Quinasa (RKIP), también conocido como fosfatidiletanolamina-proteína de unión 1, ha sido implicado como modulador de la señal de varias vías de transducción que controlan el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, y la migración (335).

El gen *RKIP* codifica una proteína que suprime el inicio de la transición epitelio mesenquimal, inhibiendo la invasión, pero sin afectar al crecimiento del tumor primario (336).

El RKIP actúa como mediador o regulador de diversas vías de señalización, entre las que encuentran la MAPK/ERK, la vía NF-kB y la vía de la proteína G (335-339).

Diversos estudios sugieren que la disminución de la expresión de RKIP puede influir en el desarrollo de metástasis, angiogénesis, resistencia a la apoptosis y mantenimiento de la integridad del genoma. Por otro lado, también se ha señalado que la expresión de RKIP previene la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis (336), pero no el crecimiento tumoral. En base a estos hechos se ha indicado que el gen RKIP es un gen supresor de metástasis e invasión tumoral, y que su expresión es un factor de protección frente al desarrollo de metástasis (336-338).

La relación inversa entre los niveles de la expresión de RKIP y la aparición de metástasis se ha descrito también en otros tumores, tales como, el carcinoma de colon y recto (340-342), estómago, nasofaringe (343,344), melanoma (345), mama (343), próstata (346) y cáncer de ovario (347, 348, 349). En éste último, la baja expresión de RKIP, no sólo se relaciona con la pérdida de adhesión celular y capacidad de invasión, sino también, con la aceleración e inducción del proceso de tumorigénesis y la proliferación celular.

Bajos niveles de RKIP se han correlacionado con la presencia de metástasis en el cáncer de mama (349). De tal modo que, su expresión disminuye notablemente en el carcinoma infiltrante de mama, en comparación con el aumento que se registra en carcinoma in situ, hiperplasias ductales y tejido mamario normal (figura 33).

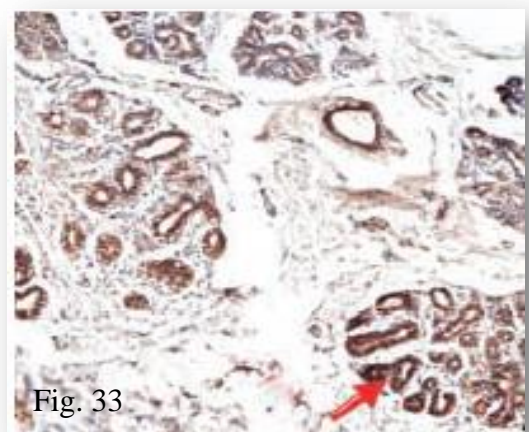


Fig. 33

La reducción de la expresión de *RKIP* se ha asociado con la invasión linfática y vascular, así como con la aparición de metástasis en carcinomas periampulares pancreáticos, vesícula biliar y extrahepáticos (347). Por lo que la disminución en la expresión de *RKIP* se considera marcador pronóstico importante para la supervivencia postoperatoria de diversas entidades, entre las que destacamos el carcinoma periampular y de vejiga urinaria (350,351), y un factor pronóstico adverso en tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (352) y carcinomas hepatocelulares (353-355).

Además de un papel importante en la progresión tumoral, el gen *RKIP* también está implicado en enfermedades no tumorales, como ciertas enfermedades neurológicas (352).

La expresión de *RKIP* se identifica mediante técnicas inmunohistoquímicas, empleando un sistema de puntuación semicuantitativo, en el que la puntuación final se obtiene de la suma de dos parámetros: porcentaje de células tumorales teñidas (0: ninguno, 1: < 25%, 2: 25-50%, 3 >50%) e intensidad de la tinción (0: ausencia de tinción, 1: tinción débil, 2 tinción moderada, 3: tinción fuerte). Los valores comprendidos entre 0 y 2 se consideran como negativos; 3 y 4 como débilmente positivos, y 5 y 6 como expresión positiva (335).

En resumen, *RKIP* es un gen que interviene en la progresión tumoral. Su expresión reducida se correlaciona con mala evolución clínica, aumento de la neovascularización, pérdida de la adhesión a la matriz extracelular, aumento de motilidad y, por consiguiente, aumento de invasión y desarrollo de metástasis, así como una disminución del período libre de enfermedad y de la tasa de supervivencia global (Figura 34 y 35).

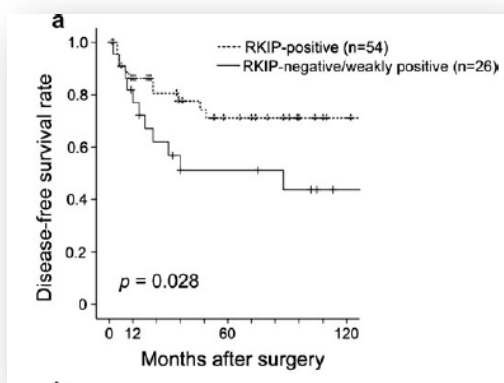


Fig. 34

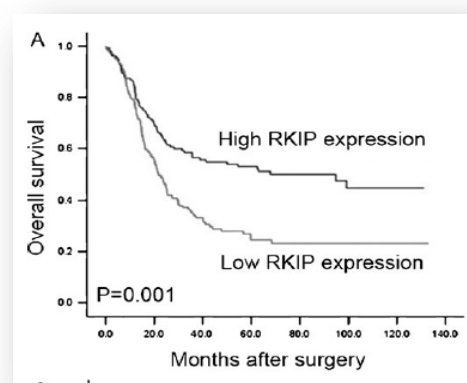


Fig. 35

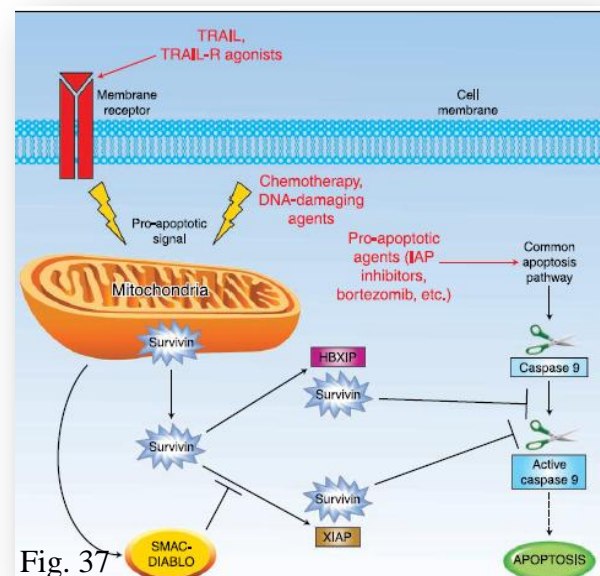
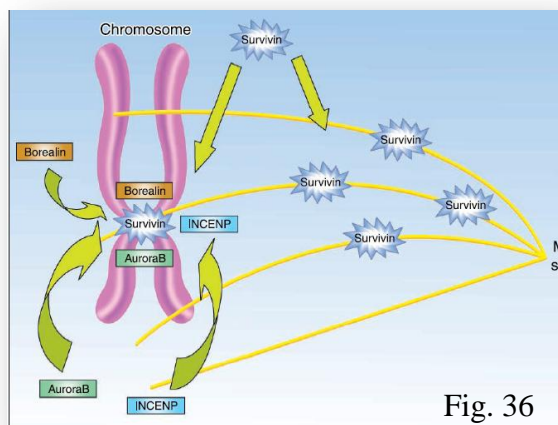
La proteína RKIP es una potencial diana molecular para el tratamiento de las enfermedades metastásicas, además de un prometedor indicador pronóstico y predictivo en varios tipos de cánceres (348).

1.19.Survivina

Durante el proceso de desarrollo de un tumor, las células cancerosas pueden perder la capacidad de autodestruirse de forma programada debido a la pérdida alélica de los activadores de muerte celular, dando lugar a un cúmulo de células con ADN aberrante. Esta pérdida de la capacidad de apoptosis es llevada a cabo por un grupo de proteínas conocidas como inhibidores de la apoptosis. Aunque la proteína Bcl-2 fue la primera que se describió con capacidad para prolongar la supervivencia, mediante el bloqueo de la apoptosis (356), posteriormente se han descrito otras. Entre ellas, destaca especialmente la survivina (357), una proteína de 16,5 KDa, también conocida como AP14, o BIRC5 (356), que es codificada por un gen localizado en el cromosoma 17q25.

Su estructura consta de un dominio inhibidor de baculovirus (BIR) de repetición, el cual lo clasifica como miembro de la familia de los inhibidores de apoptosis (IAP). A través de este dominio desempeña la característica función de inhibir la apoptosis interfiriendo con la función de las caspasas (357) mediante la interacción previa con cdk4 y p21 (358), que conduce a la inhibición de la caspasa 3, la caspasa 7 (359) y la caspasa 9 (360). Otra de sus funciones se basa en la regulación del ciclo celular mediante la asociación con los microtúbulos del huso mitótico. La transcripción de survivina se incrementa durante la fase G1 y alcanza un máximo en la fase G2-M (361); de manera que influye en la viabilidad y división celular (358).

Así pues, las principales funciones de la survivina son la regulación de la división celular (Figura 36) y la inhibición de la apoptosis (Figura 37) (361).



A diferencia de bcl-2 y otras proteínas inhibidoras de la apoptosis (356), la survivina es indetectable en los tejidos adultos maduros y bien diferenciados en condiciones de normalidad, excepto en placenta, timo y endometrio. En cambio, se expresa en células del cáncer de pulmón, colon, páncreas, próstata y mama, así como también, en linfomas de Hodgkin de alto grado. De manera que encontramos expresión de survivina en tejidos neoplásicos entre el 30% y el 100% de los casos registrados (357), destacando su expresión en prácticamente la totalidad de las células tumorales. A pesar de su papel en la apoptosis y división celular, no se ha demostrado una relación estadísticamente significativa entre expresión de survivina y mayor índice mitótico en el tejido neoplásico (357).

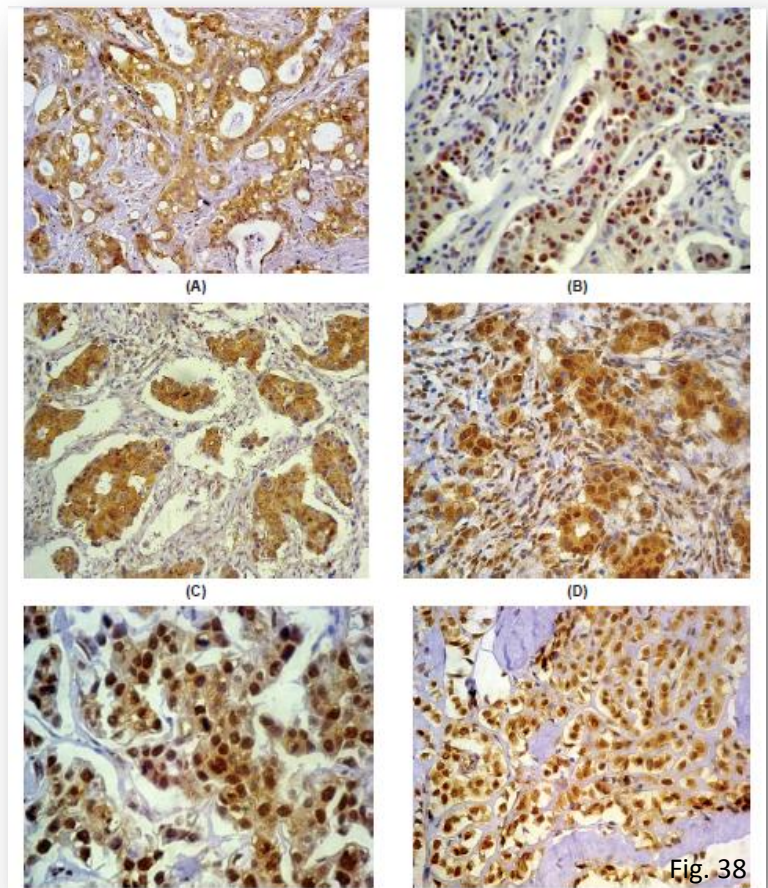
De esta manera, la survivina impide la muerte de las células tumorales, y promueve su proliferación descontrolada. Este importante papel ha sido estudiado en diversas neoplasias, siendo muy escasas las publicaciones sobre el cáncer de mama (358).

La expresión de la survivina se evalúa mediante estudio inmunohistoquímico y se basa en la valoración de la tinción nuclear y citoplasmática. Aunque un método de valoración de su expresión se ha realizado de muy diversas formas, la más utilizada es la valoración individualizada de la intensidad de tinción y del porcentaje del tejido tumoral teñido, para su posterior multiplicación y obtención de un resultado final numérico (357).

La intensidad de la tinción se gradúa en débil (1+), moderada (2+) e intensa (3+); y el porcentaje de tejido teñido en 5 tramos: < del 5% (0), 5-20% (1), 21-50% (2), 51-75% (3), >75% (4). Los casos con puntuación <1 se consideran negativos, mientras que los ≥ 1 son positivos (357).

A su vez, la expresión de la survivina se estratifica en grado I, grado II y grado III (Figura 38).

Diversos estudios han señalado que la tinción inmunohistoquímica puede encontrarse en el núcleo o en el citoplasma y que sólo la presente en el citoplasma está fosforilada y representa la forma activa. De manera que la survivina nuclear y la ausencia de fosforilación hacen posible la inducción de la apoptosis, revelando esta tinción un mejor pronóstico que la tinción citoplasmática (356-358).



Estudios recientes han revelado baja expresión de survivina en los tumores de mama con fenotipo luminal, y alta, en fenotipos basal-like (357), sobreexpresión de EGFR (362) y estrés celular (363).

La expresión de survivina aporta información pronóstica útil al relacionarse con menor supervivencia, mayor aceleración y progresión de la enfermedad, menor tiempo de recurrencia y reducción del tiempo libre de enfermedad, tanto en pacientes con cáncer de mama, como con otras neoplasias, especialmente en carcinoma colorrectal, gástrico y en el neuroblastoma (357).

Por último, destacar el importante papel de la survivina en el tratamiento de ciertos tumores, debido a su función en la supervivencia de las células cancerosas. La expresión de survivina se relaciona con mayor resistencia y menor efecto al tratamiento con radiación y quimioterapia. El conocimiento del nivel de expresión permite seleccionar el tratamiento más adecuado en tumores agresivos (357).

Los últimos estudios mencionan a la molécula YM155 como principal fármacos diana molecular en la actualidad, que bloquea la función de la survivina (364); demostrando que la survivina es un objetivo universal en las redes intrínsecas de búsqueda de supresión tumoral (365).

1.20.TOPO-2alfa

La topoisomerasa 2 alfa (TOP2A) es una enzima nuclear codificada por el gen *TOP2A*. Esta enzima controla los estados topológicos del ADN durante la transcripción genética y está implicada en procesos tales como la condensación del cromosoma, la separación de las cromátidas y la liberación de la tensión de torsión durante el proceso de transcripción, proliferación celular y replicación del ADN.

Se han descrito dos formas de topoisomerasa, la alfa, codificada por el gen *TOP2A*, ubicada en el cromosoma 17 (17q12-17q21) y la forma beta, localizada en el cromosoma 3 (299).

La expresión de la proteína topoisomerasa IIa varía en las distintas etapas del ciclo celular, existiendo picos en la fase G2 y M, y reducción al mínimo al final de la fase M (299).

La proteína actúa como una enzima que repara las alteraciones durante los diversos procesos del metabolismo del ADN, incluyendo la transcripción, recombinación, replicación y segregación cromosómica durante la división celular.

El análisis inmunohistoquímico define como positiva aquella situación en la que existe expresión en > 5% de las células tumorales (Figura 39). Esta expresión proteica se correlaciona con la amplificación del gen *TOP2A*, que se puede demostrar mediante las técnicas de FISH y CISH (299).

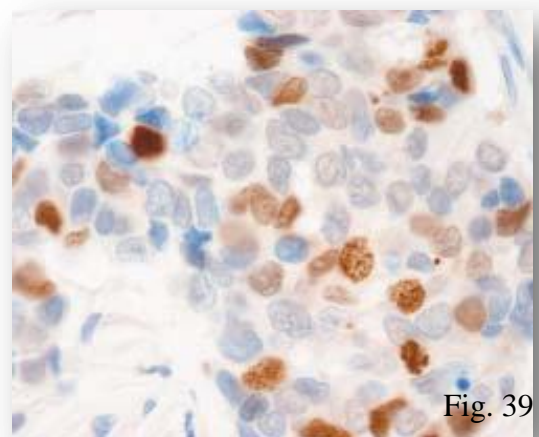


Fig. 39

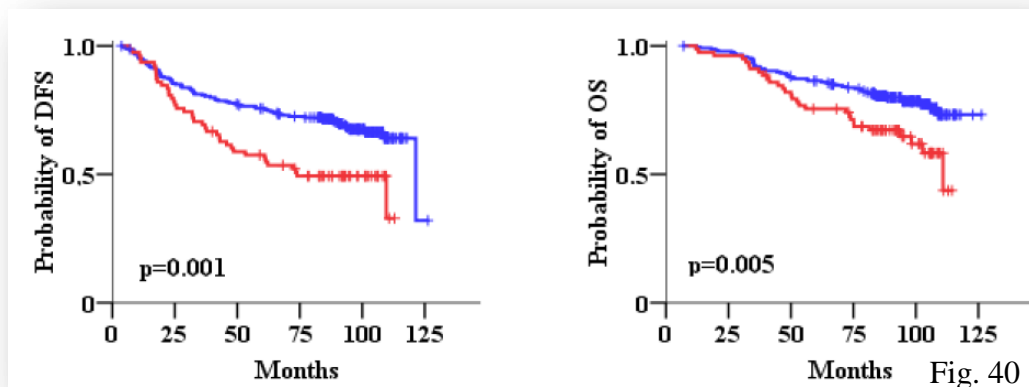
Estudios recientes en cáncer de mama han demostrado que la sobreactividad puede bloquearse mediante el uso de inhibidores de la TOP2A, como la doxorrubicina. Este hecho convierte a este gen y a su proteína en dianas específicas para el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado.

El gen *TOP2A* se encuentra a una distancia telomérica de 700 kb del gen *HER2* y, en un determinado número de casos, la amplificación de *HER2* arrastra por contigüidad al gen *TOP2A*, con una consecuente co-amplificación de ambos genes.

Estos casos de co-amplificación HER2-TOP2A tienen especial interés terapéutico para el uso de antraciclinas y otros agentes quimioterapéuticos (296, 306, 366).

Aunque la co-amplificación HER2-TOP2A se observa en el 30% - 40% de tumores con amplificación del gen HER2, la delección de TOP2A también se presenta con frecuencia (367).

Niveles elevados de TOP2A se asocian a peor pronóstico, menor tasa de supervivencia, y menor tiempo libre de enfermedad (Figura 40) (368), pero también a una mejor respuesta a las antraciclinas. Por lo que la amplificación del gen TOP2A se considera un marcador predictivo de respuesta a antraciclinas (369-371).



Se distinguen dos parámetros diferentes de TOP2A: la amplificación del gen, y la expresión de ARNm. Ambos parecen tener un claro impacto sobre el resultado de cáncer de mama de los pacientes tratados con tratamiento adyuvante.

Existen estudios que sugieren que la sobreexpresión de la proteína Topoisomerasa II alfa, en lugar de la amplificación del gen TOP2A, es el principal indicador predictivo y pronóstico de la respuesta del paciente ante tratamiento adyuvante con antraciclina (296).

La expresión ARNm de TOP2A y la expresión de proteínas TOP2A se encuentran intensamente relacionados entre sí, pero no muestran relación con el estado del gen TOP2A.

Esta falta de asociación entre el gen TOP2A y los productos génicos de TOP2A (ARN y proteínas) se ha confirmado en varios estudios (372). Una posible explicación a este dato se basa en la mayor demanda de proteína TOP2A durante la replicación del ADN, con respecto al número de copias del gen necesarias, por lo tanto, el gen correspondiente se transcribe de forma independiente al número de copias o de oncogenes activados existentes (373,374).

La amplificación de TOP2A se ha señalado exclusivamente en aquellos carcinomas de mama con amplificación de HER2, de tal modo que no hay casos de amplificación de TOP2A en ausencia de amplificación de HER2.

Como se ha mencionado anteriormente, la delección de TOP2A es otra alteración cromosómica que puede asociarse a amplificación de HER2. Este hallazgo se observa en el 11% de los tumores HER2-amplificados (299). Pero hasta la fecha se desconoce su significado y su mecanismo de producción.

Es importante tener en consideración los siguientes puntos, ratificados en diversos estudios:

1. La amplificación de *TOP2A* se produce exclusivamente en presencia de la amplificación de *HER2* y se lleva a cabo mediante un proceso de repetición de rotura-fusión-puente (299).
2. La amplificación del gen *TOP2A* se asocia a una sobreexpresión de la proteína TOP2A con una frecuencia > 70% en los tumores de mama (296).
3. Los casos en los que la amplificación del gen no se acompaña de sobreexpresión de la proteína, (tinción inmunohistoquímica negativa), pueden explicarse como consecuencia de la pérdida de la antigenicidad durante el procesamiento de tejido. Otra posible razón de esta disparidad puede deberse a que la expresión de TOP2A está vinculada al ciclo celular y como tal, a la tasa de proliferación celular; parámetro independiente al número de copias oncogénicas.

La topoisomerasa II alfa se considera, además de factor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento adyuvante, un marcador de proliferación celular (299).

1.21.Perfiles Moleculares

Actualmente, y a pesar de los grandes avances y estudios centrados en la búsqueda de la erradicación del cáncer de mama, éste continúa siendo la segunda causa de muerte por cáncer en la población femenina.

El proceso de desarrollo tumoral comienza en la base del tumor primario y termina en la localización del tumor secundario. En el cáncer de mama, el riesgo de metástasis puede predecirse en base a la expresión global de genes del tumor primario, lo cual cuestiona la hipótesis que defiende que el carácter metastásico es adquirido en fases tardías de la formación del tumor primario (375) (Figura 41). Destacamos sin embargo, diversos estudios que han confirmado la conservación de las firmas moleculares del tumor a lo largo de su vida, incluso tras el desarrollo de metástasis, lo cual relaciona directamente la firma molecular del tumor primario con el tipo de tumor (376,377).

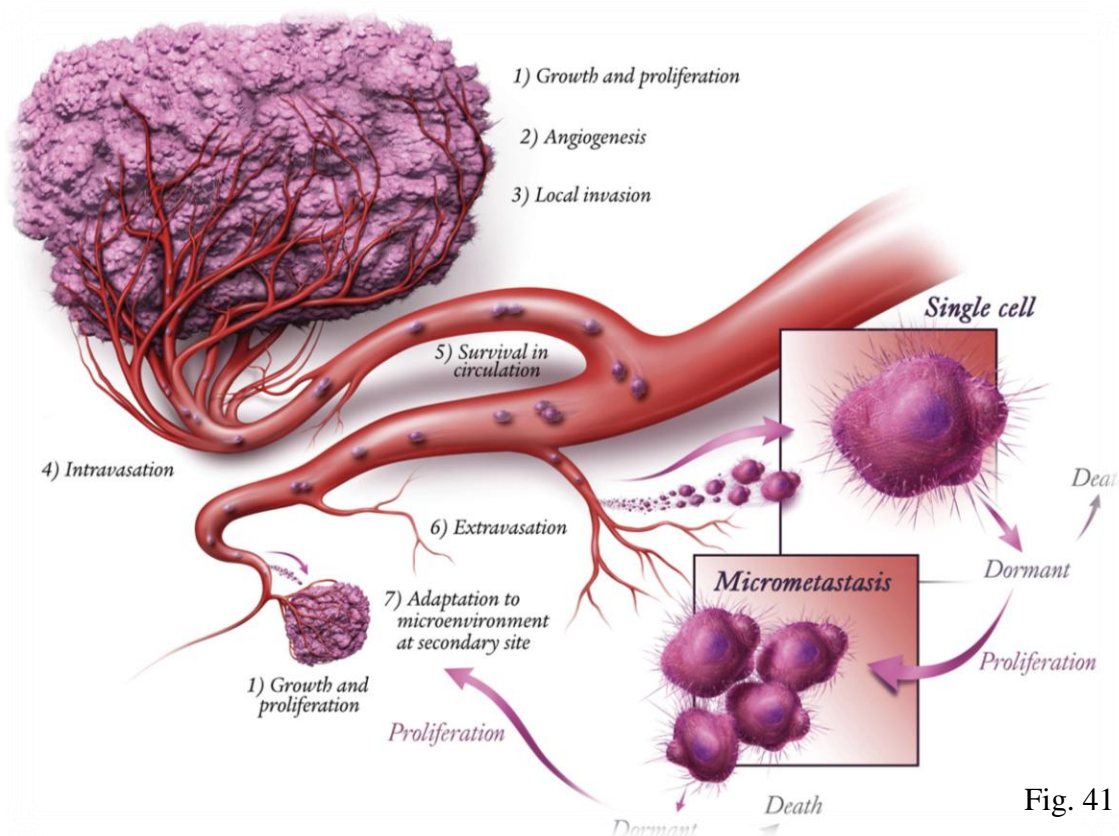


Fig. 41

Definimos la firma molecular como la expresión genética personalizada e individualizada que presenta cada uno de los 400 tipos de células diferentes del cuerpo.

Se ha demostrado que los perfiles génicos conservan su patrón de expresión en el tumor metastásico, de tal modo que el perfil génico de un tumor metastásico de origen desconocido puede ayudar en la identificación de la localización del tumor primario.

El perfil génico también se conserva, no sólo tras la invasión de las células tumorales, sino también durante el proceso de desdiferenciación tumoral. De manera que el perfil génico de un tumor bien diferenciado, se mantiene en una fase evolucionada del mismo de tipo pobremente diferenciado (378,379).

Por lo tanto, la identificación de los diferentes perfiles génicos ofrece información valiosa y aporta gran ayuda para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción; siendo de esta manera, objeto de estudio en la actualidad (380,381).

Otra utilidad importante de la identificación del perfil genético es la valoración de su tendencia o propensión a producir metástasis. Esta información permite adoptar medidas terapéuticas más agresivas en aquellos pacientes de alto riesgo, que impliquen una mayor respuesta a la quimioterapia, o adoptar una posición expectante, en la que se decide que el paciente es de bajo riesgo y no es necesario su tratamiento con quimioterapia (380).

El fundamento del desarrollo de los perfiles genómicos, para el pronóstico y la predicción de respuesta a la quimioterapia se basa en la hipótesis de que la historia natural de un tumor viene determinada por las vías de genes reguladores. De esta manera, los genes implicados en el proceso de metástasis se identifican mediante un estudio comparativo del genoma de expresión de pacientes con cáncer de mama y metástasis con el genoma de pacientes con cáncer de mama y sin metástasis. Así pues, esta prueba nos permite determinar la secuencia genómica implicada en la metástasis, identificar a los pacientes que la presenten, así como clasificar a estos pacientes en base a su mayor o menor riesgo de desarrollo de metástasis.

Entre los distintos perfiles genéticos identificados en la actualidad, destacamos: (Figura 42)

Table 1 Commercially available multigene assays for breast cancer prognosis and/or prediction.

	MammaPrint	OncoTypeDX	Mapquant DX	Theros	Bioclassifier	MammoStrat
<i>Also known as</i>	70-gene signature	21 gene recurrence score	Genomic grade test	H/I and Molecular grade index	PAM50	Five antibody test
<i>Manufacturer</i>	Agendia	Genomic Health	Ipsogen	Biotheranostics	ARUP	Applied Genomics
<i>Assay method</i>	Gene expression array	RT-PCR	Gene expression array	RT-PCR	RT-PCR	IHC
<i>Number of genes</i>	70	16	97	2+6	50	5
<i>Development</i>	Van 't Veer, 2002 [6]	No published manuscripts	Sotiriou, 2006 [34]	Ma, 2004 (H/I) [9] Ma, 2008 (MGI) [37]	Parker, 2009 [11]	Ring, 2006 [38]
<i>Validation on prognosis</i>	Van de Vijver, 2002[18] Buyse, 2006 [19] Bueno-de-Mesquita, 2008 [20] Wittner, 2008 [21] Mook, 2008 [22] Mook, 2009 [23]	Paik, 2004 [8] Esteve, 2005 [28] Habel, 2006 [29] Dowsett, 2008 [30]	Sotiriou, 2006 [34] Loi, 2007 [35]	Ma, 2006 (H/I) [4]	Parker, 2009 [11]	Ross, 2008 [39]
<i>Validation on prediction</i>	Knauer, 2009 [24] Bender, 2009 [25] Straver, 2009 [26]	Paik, 2006 [31] Albain, 2007 [32]	Symmans, 2008 [36]	No published manuscripts	Parker, 2009 [11]	No published manuscripts
<i>Feasibility in clinical practice</i>	Bueno-de-Mesquita, 2007 [27]	Oratz, 2007 [33]	No published manuscripts	No published manuscripts	No published manuscripts	No published manuscripts
<i>Prospective randomized trial</i>	MINDACT	TAILORx	no	no	no	no
<i>FDA status</i>	Ongoing FDA cleared, safe and effective	Ongoing Not cleared	Not cleared	Not cleared	Not cleared	Not cleared

Fig. 42

1.- MammaPrint. Perfil genético dirigido a valorar el pronóstico del cáncer de mama, así como la predicción de su evolución. Fue desarrollado en el año 2001, en Amsterdam, por el instituto de cáncer de los Países Bajos (NKI) para ayudar en el tratamiento del cáncer de mama en fase inicial (382).

Permite distinguir entre pacientes con alto riesgo de metástasis, candidatos a tratamiento con quimioterapia, de aquellos otros con bajo riesgo y, por tanto, menos receptivos al tratamiento quimioterápico y con menores resultados y beneficios.

En su desarrollo inicial, se emplearon pacientes procedentes de un banco de tejidos integral, distribuidos en dos grupos: unos con riesgo de metástasis de cáncer de mama a los 5 años; y otros que permanecieron libres de metástasis, considerados de bajo riesgo. La técnica de Microarray permitió un análisis de todo el genoma, que se relacionó con la evolución de la enfermedad, y permitió la distinción de pacientes con riesgo de metástasis tempranas de aquellos otros libres de ellas (383).

Además de lo anteriormente mencionado, MammaPrint fue determinado para proporcionar información pronóstica más allá de lo que se puede determinar a partir de factores como la edad del paciente, el grado tumoral, el tamaño y el estado de los receptores de estrógenos, en una población de pacientes con ganglios linfáticos negativos, sin tratamiento adyuvante endocrino o quimioterápico (383).

2.- OncotypeDX. Este perfil ha demostrado su importancia en el desarrollo del cáncer de mama, así como en la predicción y probabilidad de recidiva a distancia en mujeres de cualquier edad recién diagnosticadas de cáncer de mama grado I o II, ganglios linfático negativo, RE-positivos, que hayan sido tratadas con tamoxifeno (383), clasificando a los pacientes en alto y bajo riesgo (Figura 43).

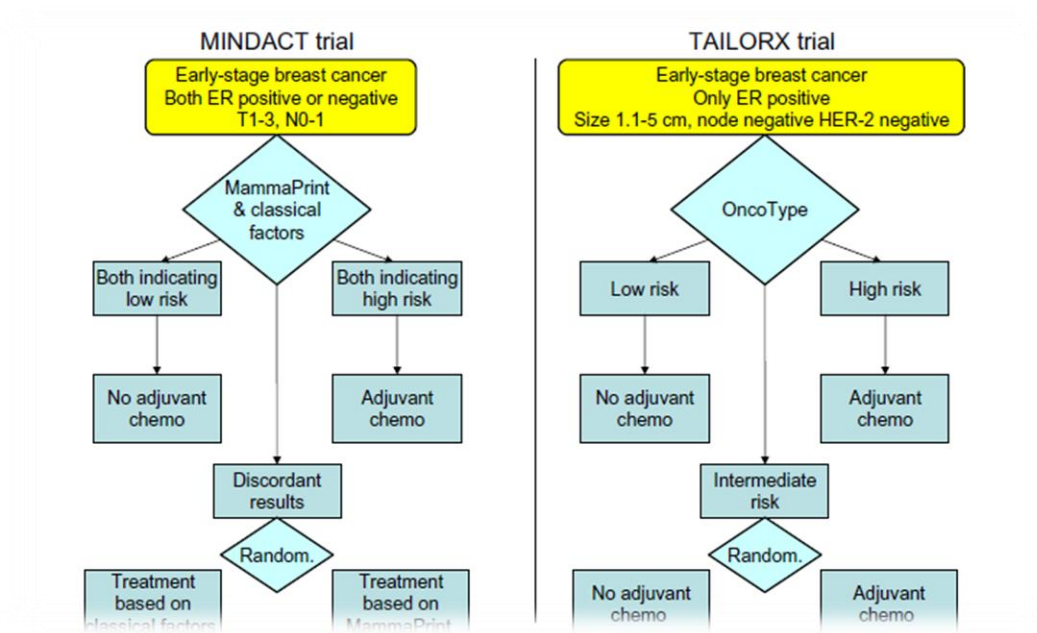


Fig. 43

Para su desarrollo se seleccionaron 21 genes, donde se incluyeron 5 genes para la normalización. El Oncotype DX ha sido validado y demostrado en tres estudios realizados en poblaciones diferentes (383, 384).

3.- Mapquant (prueba de grado Genómica). Este perfil de expresión génica se comercializó con objetivo pronóstico en el carcinoma de mama. Su desarrollo se llevó a cabo con 97 genes asociados con la diferenciación tumoral y el grado tumoral en dos grupos de paciente: uno con grado histológico 3, y otro grado histológico 1, de 64 muestras de tumores de mama con RE positivos.

Los datos obtenidos mostraron una mejor asociación con el tiempo libre de enfermedad o supervivencia libre de recidiva, que con el propio grado histológico del tumor.

Numerosos estudios recientes han confirmado la asociación de un Grado genómico alto o Mapquant DX alto, con una mejor respuesta a tratamiento neoadyuvante con quimioterapia (380,381,383).

4.- Theros. Este perfil genómico, también conocido como índice H/I y grado molecular, fue desarrollado específicamente para pacientes con cáncer de mama RE positivo tratadas con tamoxifeno. Su desarrollo se llevó a cabo en 60 pacientes con el objetivo principal de predecir el riesgo de metástasis a distancia (380), catalogando a los pacientes en alto y bajo riesgo.

El perfil Theros o MGI presenta, de forma similar al perfil Mapquant DX, una clasificación de los pacientes en base a su grado histológico, distinguiendo el MGI a los pacientes con cáncer de mama grado histológico 2, en alto y bajo riesgo de metástasis.

El estudio Theros está compuesto por 5 genes; 4 de los cuales son parte de los 97 genes que componen el Grado genómico o Mapquant.

5.- PAM50. El perfil PAM50 lleva a cabo la bioclasiificación en subgrupos específicos: basal-like (triple negativo), ERBB2 y los dos luminales A y B, ambos con RE positivos. Estos subgrupos moleculares, presentan una clínica y respuesta a la terapia diferentes.

6.- MammoStrat. Este análisis se basa en el estudio de la expresión de un grupo reducido de genes mediante la técnica inmunohistoquímica (381). Para ello emplea 5 anticuerpos que podrían ser combinados y se utiliza para la predicción del resultado en pacientes con cáncer de mama y RE positivos.

MammoStrat clasifica a los pacientes en tres categorías de riesgo para el desarrollo de metástasis a distancia: bajo, moderado y alto riesgo. Los pacientes jóvenes de bajo riesgo presentaron un índice de progresión de la enfermedad del 20%, frente al 6% que presentaron los pacientes de bajo riesgo mayores de 60 años. De la misma forma, los pacientes de alto riesgo tratados con quimioterapia, presentaron una disminución de la tasa de recurrencia del 21%.

En conclusión, es importante destacar que la medicina molecular está realizando descubrimientos en los patrones de la genómica y la proteómica en diferentes cánceres, incluido el cáncer de mama con el objetivo de identificar nuevos marcadores biológicos y poder administrar una terapia más sensible y específica.

La combinación de uno o varios genes, juntos con los factores pronósticos clínicos y patológicos tradicionales, nos permitirá una mejor comprensión y mayor conocimiento de la biología del tumor y la posibilidad de desarrollar una terapia más personalizada.

1.22.Matrices Tisulares

Desde hace más de dos décadas, se han venido describiendo diferentes métodos para estudiar simultáneamente distintos tejidos en un solo portaobjetos.

El primer estudio fue la “salchicha multitejido” descrita por Battifora (385) en 1986. A este intento inicial le siguió el bloque de tejido multitumor (MTTB), que permitía la incrustación de 100 o más muestras de tejido en un bloque de parafina de tamaño normal.

Esta idea fue profundizada posteriormente por Wan et al (386) mediante el desarrollo de un método flexible, eficiente y rápido basados en la preparación de 'núcleos' de tejido incluido en parafina a partir de bloques de histología estándar. Los núcleos de parafina eran enderezados e insertados en un corte de carcasa montado en un bloque de parafina, el cual posteriormente era seccionado. Este método permitía organizar en un portaobjetos más de 120 muestras de tejidos individuales para la detección o caracterización de un determinado antígeno con solo 0,25 ml de anticuerpo primario diluido.

Numerosos estudios posteriores han confirmado la viabilidad del método y el notable ahorro económico y de tiempo. De hecho, los MTTBs se vienen utilizando rutinariamente para evaluar la sensibilidad de la técnica en inmunohistoquímica.

Por otra parte, el gran número de secciones casi idénticas que ambos métodos permiten obtener de una sola preparación, ha confirmado su utilidad y eficiencia en la escala de control de calidad de grandes estudios realizados (385).

Este método ha ido evolucionando hasta el utilizado actualmente (tissue microarray -TMA-) desarrollado por Kononen (387) en 1998.

Habitualmente, las matrices tisulares son una herramienta de investigación, aunque pueden tener finalidad docente, para agrupar casos poco frecuentes con escaso material disponible o para mostrar distintos patrones de tinción inmunohistoquímica sobre tejidos diferentes.

Se han definido varios tipos de TMAs según su finalidad:

- TMA de prevalencia. Constituido por uno o varios tumores simples, sin aportar previamente información clínica o patológica. Se utiliza para determinar la prevalencia de una determinada alteración en un área concreta en un tumor.
- TMA multitumor. Contienen muestras de diferentes tumores, habitualmente orientados al cribado de alteraciones moleculares.
- TMA de progresión. Incluyen diferentes estadios evolutivos de un mismo tumor. Son utilizados para determinar la asociación entre el genotipo y el fenotipo de un tumor.
- TMA de pronóstico. Valoran de forma rápida tumores de los que se conocen datos clínicos y de evolución. El uso de este tipo de TMA permite establecer asociaciones entre características clínicas y moleculares del tumor.
- TMA experimental. Constituido a partir de un TMA simple ya archivado, con el objetivo de evaluar nuevos anticuerpos y buscar patrones genéticos.

En la actualidad, el proceso de creación de lo que hoy en día conocemos bajo el nombre de tissue microarray (TMA) consiste, en esencia, en obtener cilindros de tejido desde un bloque de parafina que contiene el tejido de interés (bloque donante) e irlos insertando en un bloque de parafina en blanco (bloque receptor), en el que se van abriendo simultáneamente los huecos necesarios. Este proceso se suele realizar utilizando distintos sistemas mecánicos comerciales desarrollados para tal fin, ya sean manuales ó automatizados.

Previamente a la extracción del tejido mediante los sistemas de agujas, el patólogo debe seleccionar el área considerada de interés sobre el porta vidrio. Posteriormente, este cristal adecuadamente marcado, se coloca sobre el bloque de parafina que contiene el tejido, permitiendo localizar con precisión el área que debe ser extraída con aguja.

Normalmente estos sistemas de TMA constan de un conjunto de agujas (conocidas como punch) de diferentes calibres que pueden ir intercambiándose para tomar tejido del bloque donante y para abrir los nichos en el bloque receptor, e incluyen un sistema

micrométrico programable que permite el desplazamiento exacto dentro del bloque receptor para colocar el número de cilindros deseado de manera uniforme y equidistante.

El diámetro del cilindro obtenido es un dato crítico y muy importante en la construcción de un TMA. Hay cuatro tamaños de punch empleados para la obtención del cilindro de tejido; 0,6 mm, 1 mm, 1,5 mm y 2 mm.

Tras diversos estudios en los últimos años, los investigadores recomiendan emplear un punch de 1 o 1,5 mm; siendo el punch de 0,6 mm reservado para aquellos TMAs constituidos por más de 200 cilindros. No se recomienda usar el punch de 2mm de diámetro. El espacio entre los distintos cilindros es un dato importante que no debe ser ignorado y debe estar en relación con el diámetro de éste, siendo recomendado como ideal o estándar un espacio de 0,3 mm entre cilindros de tejido de 1mm de diámetro.

Una vez creado el TMA, la superficie de éste debe ser alisada y seccionada. Este proceso se lleva a cabo sometiendo al TMA a temperaturas de entre 70-80°C hasta conseguir reblandecimiento de la parafina que une cada cilindro, y permitir así su manipulación. Posteriormente, los TMA son conservados a una temperatura de 37 °C.

La sección de los tissue microarrays se realiza de modo rutinario en un micrótopo, obteniendo cortes de entre 4-5 micras.

Los cortes obtenidos se recogen en portas y deben conservarse a -20 °C, hasta que sean utilizados.

Con sistemas de este tipo se pueden construir TMAs de alta densidad que pueden incluir hasta 1200 cilindros en un solo bloque, aunque en la práctica suelen contener entre 100 y 400.

Nuestro trabajo presenta un método manual de construcción de TMAs de baja densidad, con el que creamos TMA capaces de contener 39 muestras en un bloque de parafina, del que pueden obtenerse cortes histológicos usando un microtopo convencional.

"No necesito un sueño, tengo un plan"

Spike Lee

2.Objetivos

La identificación en el cáncer de mama de distintas alteraciones genéticas y el desarrollo de técnicas de análisis de alto rendimiento ha permitido en la última década la definición de distintos patrones de expresión genómica con valor pronóstico. De ellos, dos, son los más conocidos, y han dado lugar a firmas génicas comercializadas como Mammaprint (383) y Oncotype (327). No obstante, el alto coste de dichas determinaciones y la infraestructura que requiere su realización son factores que limitan de forma importante su incorporación a la práctica clínica rutinaria. Aunque recientemente se ha comenzado a utilizar tejido fijado en formol e incluido en parafina, con frecuencia, este tipo de técnicas requiere del empleo de tejido en congelación, muestra que en lesiones pequeñas no es posible obtener, ya que comprometería el diagnóstico en tumores de pequeño tamaño.

Teniendo en cuenta que en la actualidad es posible estudiar mediante técnicas de inmunohistoquímica el producto proteico postranscripcional de muchos de los genes implicados en el desarrollo y progresión tumoral, es posible definir una “firma inmunohistoquímica” que tuviese valor pronóstico en el cáncer de mama.

Trasladar a la práctica clínica la aplicación de dicho perfil sería más fácil, teniendo en cuenta el menor coste que supondría y la mayor accesibilidad a este tipo de técnicas, que se encuentran en cualquier laboratorio convencional de Anatomía Patológica.

Existen algunas descripciones de perfiles inmunohistoquímicos en la literatura, la mayor parte de ellos sustentados sobre inmunohistoquímica cuantitativa (388-390), y que han demostrado valor predictivo en distintas subpoblaciones de cáncer de mama.

El objetivo principal de nuestro trabajo es intentar definir un perfil inmunohistoquímico que muestre valor predictivo en pacientes con cáncer de mama. Para ello estudiamos la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores, que correspondan a proteínas producto de genes implicados en proliferación (Ki67, p53, survivina, CDK2, TOP2A), crecimiento tumoral (HER2, c-Kit), invasión y metástasis (TWIST, E-cadherina, RKIP, fascina, caveolina, CD10), marcadores de stem cells (CD44, CXCR4), factores predictivos de respuesta (ABCG2) y de subtipo tumoral (RE, RP, CK5-6, FOXA1). Esta selección de anticuerpos se ha realizado de acuerdo a su función y disponibilidad.

“No. No lo intentes. Hazlo o no lo hagas, pero no lo intentes”

El imperio contraataca. Episodio V saga Star Wars

3.Material y Métodos

3.1. Selección de casos

El listado de pacientes se obtuvo del programa Vitropath®, que recoge toda la información generada en el servicio de Anatomía Patológica. A través de un sistema de consultas, se filtran los casos seleccionados y la información obtenida se vierte en una base de datos externa. El listado de pacientes obtenido se anonimizó parcialmente durante la recogida de información, eliminándose del mismo, nombre y apellidos de las pacientes y conservándose inicialmente NUHSA, NHC y número de registro de la prueba (número de biopsia) para comprobar duplicidades de casos o recidivas. De cada caso se obtuvo información relativa a las características del tumor (tamaño, grado histológico, número de ganglios metastáticos y totales obtenidos) y datos relativos a la evolución del paciente (tiempo libre de enfermedad, supervivencia). Esta última información se obtuvo del sistema informático del Hospital.

El estudio está diseñado de forma que todos los pacientes incluidos tengan un seguimiento mínimo de 5 años. El tiempo libre de enfermedad (TLE, expresado en meses) se calculó hallando la diferencia entre la fecha de diagnóstico y la fecha del primer evento positivo detectado en la historia clínica (recidiva, metástasis,...). La supervivencia global (expresada en meses) se calculó asimismo hallando la diferencia entre la fecha de éxitus y la fecha de diagnóstico.

Se cerró la recogida de datos clínicos y de seguimiento el día 6/VII/2012; por tanto, esta es la fecha final de seguimiento en aquellos casos en los que a dicha fecha no se produjese recidiva o éxitus.

En relación a la recidiva, en el caso de que ésta existiese desde que se inició el estudio hasta que se cerró, se indica la fecha de la misma, para poder obtener el TLE (tiempo libre de enfermedad). Si ésta no se hubiera producido, al igual que en el caso del éxitus, se indica la fecha de cierre del estudio. Por último, en aquellos casos en que no se produjo recidiva secundaria a la enfermedad, pero sí éxitus del paciente, la casilla procedió a dejarse en blanco, puesto que consideramos incongruencia estadística, indicar una fecha de recidiva (fecha cierre del estudio) posterior a la del éxitus.

Una vez recogida toda la información necesaria, y eliminados los duplicados, se anonimizó totalmente la base de datos, eliminándose de la misma NUHSA y NHC, y sustituyéndose el número de biopsia por un número ordinal correlativo que correspondía a cada caso y que fué el que identificó al mismo durante el resto del estudio. El número inicial de casos fue de 250, y tras eliminación de duplicados y pacientes con tratamiento neoadyuvante previo a la intervención quirúrgica, el número final que conformó el estudio fue de 234.

El proyecto del estudio fue aprobado por la comisión de ética del Hospital antes de proceder a su realización.

3.2. Tejido

El tejido empleado en el estudio se obtuvo de piezas quirúrgicas fijadas en formol durante 24 horas e incluidas en parafina. Los bloques de tejido se recuperaron del archivo del Servicio de Anatomía Patológica una vez seleccionados los campos de interés y se almacenaron en una habitación a una temperatura aproximada de 20°C previamente a la construcción de los TMAs.

3.3 Construcción de los TMAs

La construcción de los tissue microarrays se realizó usando un método manual, basado en una modificación de un método descrito previamente en la literatura.

Para obtener el tejido de los bloques donantes, utilizamos el kit de biopsia de médula ósea (Figura 44), compuesto por un trocar con un diámetro de luz de 2,5 mm y una guía para la recuperación posterior del cilindro del interior del trocar.

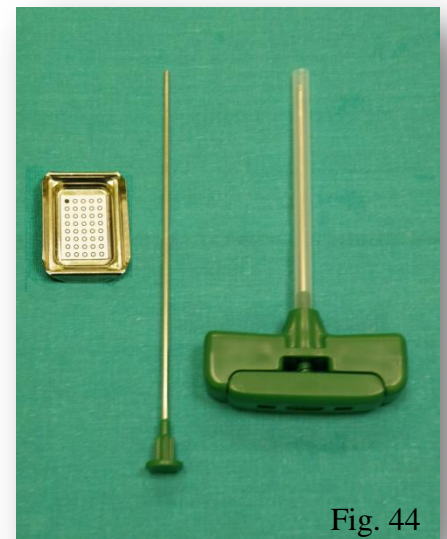


Fig. 44

Para construir el TMA se diseñó una plantilla en papel, de la medida del molde de parafina, que incluía 40 posiciones (cinco columnas de ocho posiciones), cada una de ellas de 2´5 mms de diámetro. Se marcó una posición en la esquina superior izquierda, que se dejaría posteriormente en blanco, a efectos de producir una asimetría en el patrón resultante que nos permitiera la correcta orientación del TMA independientemente de cómo fuese recuperada la sección tisular en la preparación histológica. Cada plantilla en papel es de un solo uso y permite la construcción de un solo bloque conteniendo un TMA.

Se colocó una cinta adhesiva de doble cara transparente sobre la superficie de la plantilla (Figura 45.A), y se colocó al fondo de un molde metálico para construir bloques de parafina (Figura 45.B). De este modo, la plantilla quedaba expuesta en el fondo del molde con una superficie de contacto adhesiva.

La construcción de cada microarray pasa por una fase previa de selección de tejido, en la que se valoraron los bloques de parafina de cada caso. La selección de los bloques a muestrear dependió de la cantidad de tumor en los mismos.

Los casos seleccionados fueron evaluados por los dos patólogos que han intervenido en el estudio. Para la selección de los campos representativos se marcaron sobre cada preparación de hematoxilina-eosina dos áreas representativas de un diámetro de 2´5 mms. La superposición de la preparación al bloque tisular permitió la identificación de las áreas de interés (Figura 45.C). Posteriormente se procedió a la obtención de cilindros mediante el método mencionado (Figura 45.D, E, F).

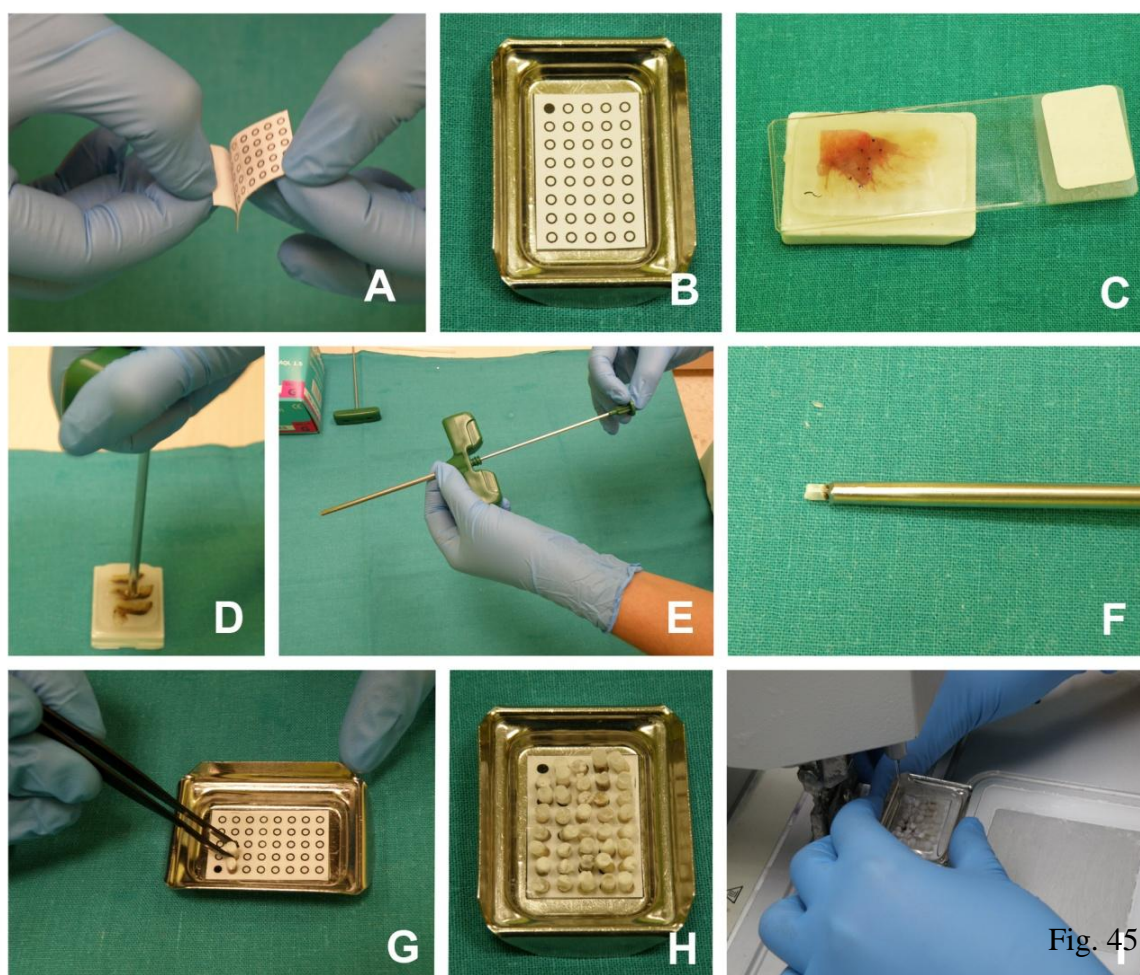
Cada cilindro se colocó, con la ayuda de unas pinzas, en cada una de las posiciones de la plantilla (Figura 45.G) hasta completar la misma, por lo que cada bloque obtenido contenía 39 cilindros de tejido (Figura 45.H).

Se marcó con tinta china el cilindro situado en la posición diagonalmente opuesta al hueco en el que no se colocó ningún cilindro, para facilitar la orientación de los casos en situaciones de pérdida de material.

Una vez que todos los cilindros fueron adheridos a la plantilla, se rellenó el molde con parafina líquida (Figura 45.I), vertida suavemente para evitar el desplazamiento de los cilindros adheridos. Enfriado el bloque, se extrajo del molde metálico, y se retiró con cuidado la plantilla de papel que ahora quedaba en la superficie del bloque.

Posteriormente, se introdujo el bloque en la estufa durante aproximadamente 2 minutos; tras sacarlo, se utilizó un portaobjetos para homogeneizar la superficie del bloque, presionando la misma durante unos segundos, y volviendo a dejar enfriar el bloque.

Se diseñó adicionalmente una plantilla para identificar los casos incluidos en cada bloque. De cada caso del estudio se obtuvieron dos muestras, que se colocaron en bloques diferentes, para evitar que un problema técnico en un bloque concreto eliminase casos del estudio. Adicionalmente, cada muestra pareada se colocó en una posición diferente a su homóloga (interior versus exterior del TMA), para evitar que problemas de difusión de los anticuerpos invalidasen casos en la misma zona.



Como medida inicial de control de calidad en los TMAs construidos, se tiñeron con hematoxilina-eosina la primera y la última sección de cada bloque para comprobar la presencia de tejido tumoral valorable en todas las posiciones de cada TMA (Figura 46). Las secciones obtenidas entre ambas, sobre las que se realizó el estudio inmunohistoquímico, se conservaron en frío (-20°C) hasta la realización de dicho estudio.



Fig. 46

Una vez evaluados los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, se comprobó que la mayor parte de los casos contenía tejido tumoral en cantidad suficiente para la evaluación de las técnicas de inmunohistoquímica, contando con dos muestras diferentes para cada caso.

En una pequeña proporción de los casos, solo contábamos con tejido tumoral viable en uno de los dos cilindros obtenidos, y en cuatro casos (los casos 70, 120, 194 y 199) no se obtuvo tejido tumoral conservado en ninguno de los dos cilindros muestreados. El reducido número de casos en los que ocurrió esta circunstancia nos permitió recuperar dichos casos para el estudio realizando las técnicas de inmunohistoquímica sobre cortes obtenidos de uno de los bloques originales del caso.

3.4. Inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico se realizó siguiendo el procedimiento estándar. Para ello se obtuvieron cortes de tejido de 4 micras de espesor de los TMAs que se deparafinaron en xilol, se rehidrataron en alcoholes decrecientes y se colocaron en un baño de buffer Tris. La peroxidasa endógena se bloqueó usando peróxido de hidrógeno al 3%. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se tiñeron con avidina-biotina para la visualización, contratiñéndose con hematoxilina. Todo este proceso se realizó de forma automatizada mediante el sistema de inmunotinción Ventana® de Roche.

Los anticuerpos primarios usados, con sus correspondientes concentraciones y tiempos de incubación se relacionan en la *Tabla Anticuerpos*.

Anticuerpo	Clona	Distribuidor	Concentración	Tiempo de incubación
Twist	Ab50887	Abcam	1:10	Hibernación 17 h. (overnight)
Caveolina	SP43	Master Diagnóstica	Prediluido	44 min
CD44	156-3C11	Master Diagnóstica	Prediluido	56 min
CDK2	SP80	Spring Bioscience	1:50	52 min
Survivina	EP2880Y	Master Diagnóstica	Prediluido	52 min
Fascina	FCN01	Master Diagnóstica	Prediluido	36 min
FOXA 1 (HFN 3α)	sc-101058	Santa Cruz Biotechnology	1:50	40 min
RKIP	sc-28837	Santa Cruz Biotechnology	1:50	32 min
CXCR4	ab2074	Abcam	1:50	40 min
Topoisomerasa II α	Ki-S1	Thermo Scientific	1:200	40 min
ABCG2	sc-58222	Santa Cruz Biotechnology	1:10	48 min

Tabla Anticuerpos

Anticuerpo	Clona	Distribuidor	Concentración	Tiempo de incubación
Ki67	SP6	Master Diagnóstica	Prediluido	28 min
P53	SP5	Master Diagnóstica	Prediluido	60 min
HER2	CB11	Roche Diagnostics	Prediluido	24 min
c-Kit	YR145	Master Diagnóstica	Prediluido	32 min
E-cadherina	EP700Y	Master Diagnóstica	Prediluido	32 min
CD10	56C6	Master Diagnóstica	Prediluido	60 min
RE	SP1	Master Diagnóstica	Prediluido	36 min
RP	SP2	Master Diagnóstica	Prediluido	52 min
CK5-6	D5/16B4	Master Diagnóstica	Prediluido	36 min

Tabla Anticuerpos

La concentración óptima y el tiempo de incubación de cada anticuerpo se obtuvieron realizando tablas de dilución sobre los controles recomendados por el fabricante, tanto en concentración como en tiempo de incubación.

En cada corte obtenido de cada TMA se incluyó el control correspondiente para cada anticuerpo, con el fin de validar la técnica.

La evaluación del estudio inmunohistoquímico se realizó de forma independiente y a ciegas por los dos patólogos que participaron en el estudio. En los casos de desacuerdo, se llegó a un consenso mediante discusión de la inmunotinción y reevaluación de las preparaciones usando un microscopio de doble cabezal.

Se valoró la inmunotinción sobre dos cilindros de cada caso incluidos en TMAs diferentes. Se obtuvieron dos resultados de cada caso y la valoración final se basó en la mayor de ellas.

En cuatro casos, como ya hemos comentado, no se identificó tejido tumoral en ninguno de los dos cilindros en los dos TMAs pareados, conteniendo exclusivamente tejido fibroadiposo y glandular mamario no neoplásico. Con el fin de no reducir la muestra de estudio, los 4 casos se recuperaron mediante la realización de la inmunotinción en cortes obtenidos de los bloques originales.

El sistema de evaluación para cada uno de los anticuerpos se basó en los sistemas descritos en la literatura para los mismos, y se relacionan a continuación.

Evaluación de las tinciones, según los diferentes anticuerpos:

Las inmunotinciones para la E-cadherina (391), Twist (392), fascina (271), ABCG2 (43), y survivina (393) se valoraron en función de la intensidad de tinción y el porcentaje de células neoplásicas teñidas. En la evaluación del porcentaje de tinción se asignaron las siguientes categorías: 0: 0% de células tumorales teñidas; 1: 0-25% de células tumorales teñidas; 2: 26.50% de células tumorales teñidas; 3: 51-75% de células tumorales teñidas y 4: >75% de células tumorales teñidas. La intensidad de tinción también se agrupó en 4 categorías: 0: ausencia de tinción; 1: tinción débil; 2: tinción moderada y 3: tinción fuerte.

Estos dos parámetros se combinaron del siguiente modo para obtener la puntuación final. En el caso de e-cadherina, fascina, ABCG2 y survivina se multiplicaron, mientras que para el twist se sumaron. El resultado numérico final se consideró positivo o negativo de modo distinto en cada anticuerpo:

E-cadherina (391):

Tinción de membrana.

Interpretación del resultado final: Se considerará la inmunotinción positiva cuando los valores finales estaban comprendidos entre 6 y 12, y negativos entre 0 y 5.

De acuerdo a esta agrupación final, el resultado positivo es equivalente a una expresión conservada de E-cadherina, mientras que el resultado negativo equivale a una pérdida significativa de la expresión de E-cadherina con respecto a las células normales.

Fascina (271):

Tinción de membrana.

Interpretación del resultado final: Se consideraron negativos aquellos casos con puntuación total entre 0 y 2, y positivos los que resultaron entre 3 y 12.

ABCG2 (43):

Tinción citoplásmica.

Se consideró que un caso mostraba alta expresión de ABCG2 si la puntuación obtenida era ≥ 4 , baja expresión si era ≤ 3 , y negativa cuando era igual a 0.

Twist (392):

Tinción nuclear.

Aquellos casos en los que la suma de ambos parámetros se encontraba entre 0-5 fueron valorados como baja expresión, asignándose alta expresión de Twist a aquellos con resultado 6-7.

Survivina (393):

Tinción nuclear.

La puntuación final para cada caso se obtuvo multiplicando ambas puntuaciones. Los casos con una puntuación final < 1 se consideraron negativos y los que resultaron > 1 como positivos.

RKIP:

Tinción nuclear.

Para valorar la expresión de RKIP se utilizó un sistema que correspondía a la suma del porcentaje de células positivas (0, negativo; 1, $< 25\%$ de células positivas; 2, 26 al 50%; y 3, $> 50\%$ de células positivas) y de la intensidad de la tinción (0,1-3; tinción negativa, débil, moderada o fuerte). Una puntuación entre 0 y 2 se consideró negativa, 3-4 fueron considerados débilmente positivos y 5-6 como positivos (349).

Caveolina 1 y CD10:

Tinción de membrana.

Se valoró la tinción de Caveolina (394) y CD10 (114) en el estroma tumoral. La intensidad se evaluó siguiendo un sistema semicuantitativo, como negativa (0, no tinción), débil (1, tanto tinción difusa de intensidad débil, como tinción fuerte en <30% de las células estromales), o fuerte (2, definida como tinción intensa de más del 30% de las células estromales). Se consideró débil intensidad a aquella tinción que comparativamente con los endotelios, era inferior y fuerte, cuando ésta era similar. Solo se valoró la presencia de tinción de membrana, con o sin tinción citoplásmica. La inmunotinción presente en células endoteliales se usó como control interno de la técnica y no se consideró a efectos de puntuación. La puntuación de mayor valor de las muestras pareadas en los dos TMAs correspondientes fue la puntuación final para cada caso.

CD44

Tinción de membrana.

La inmunotinción se estratificó en cuatro subgrupos reproducibles (395): Negativo, cuando no existía inmunotinción detectable ó bien había expresión débil en menos del 5% de las células tumorales, 1, cuando la expresión de la tinción en las células neoplásicas comprendían entre el 5-25%, 2, cuando afectaba al 25-75% y 3, cuando era superior al 75%.

A efectos estadísticos, todos los casos que expresaron CD44 de + a +++ (con valores numéricos de 1 a 3) fueron considerados positivos. Aquellos casos límite (-/+) se volvieron a revisar en conjunto hasta alcanzar un consenso entre ambos observadores. Los casos con expresión CD44 – se consideraron negativos.

CXCR4

La inmunohistoquímica con CXCR4 puede mostrar patrones de tinción citoplásmica o nuclear. Nosotros valoramos ambas expresiones por separado.

La inmunotinción citoplásmica para CXCR4 se catalogó en base a la Intensidad y el porcentaje de tinción; confiriendo valor 1: en tinción leve o negativa; 2: en tinción de intensidad y porcentaje medios, mostrando coloración amarillenta; 3: con tinción fuerte y de color marrón. A su vez, el valor 1, se consideró negativo, y los valores 2 y 3, fueron considerados como positivos.

Por otra parte, la valoración de la tinción nuclear, se clasificó en 0: expresión baja o tenue; y 1: expresión fuerte de color marrón. Siendo 0: negativo y 1: positivo (4).

Receptores de estrógeno y progesterona

Tinción nuclear.

Se utilizó el sistema de Allred, basado en la estimación de dos parámetros, el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción en la mayoría de las células evaluadas (396). Se suman los dos parámetros y se obtiene una puntuación final con 8 posibles valores.

El Porcentaje de tinción se evaluó del siguiente modo: 0: 0% de células tumorales teñidas, 1: tinción < 1%; 2: tinción entre 1-10%; 3: tinción del 11-33%; 4: tinción del 34-66% y 5: tinción en > 67%. En relación con la intensidad, se distinguieron 4 categorías: 0: ausencia de tinción; 1: débil; 2: moderada y 3: fuerte.

El puntuación final se obtuvo de la suma de ambos parámetros. Los valores comprendidos entre 0 y 2 se consideraron negativos y entre 3 y 8 como positivos.

FOXA1 (HFN3 α)

Tinción nuclear.

Se valoró la inmunotinción en 11 categorías teniendo en cuenta la proporción de células que mostraban positividad nuclear (0: ninguna; 1: $\leq 10\%$; 2: 11-20%;... y respectivamente hasta el 100%, por lo que el rango de puntuación se encontraba entre 0 y 10), y la intensidad de la tinción (1, 2 o 3 para tinción débil, moderada o fuerte). La puntuación final se obtuvo multiplicando entre sí ambos parámetros (con un rango entre 0 y 30). Se consideró baja expresión de FOXA1 cuando el resultado se encontraba entre 0 y 3, y alta cuando estaba entre 4 y 30 (285).

HER2

Tinción de membrana.

La valoración de la expresión de HER2 se realizó de acuerdo a las recomendaciones definidas y actualizadas en el año 2013 por la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) (311). Se distinguieron cuatro grupos: 0 (-): no se observa tinción de membrana o ésta es incompleta y apenas perceptible en $< o = 10\%$ de las células tumorales; 1(-): se observa tinción de membrana incompleta y apenas perceptible en $> 10\%$ de células tumorales; 2 (equívoco): tinción de membrana incompleta débil o moderada en $> 10\%$ de las células tumorales o tinción de membrana completa o intensa en $< o = 10\%$ de las células tumorales; 3 (+): tinción de membrana completa e intensa en $> 10\%$ de las células tumorales. En el resultado final, los grupos 0 y 1 se consideran negativos. El grupo 2 refleja un resultado dudoso o equívoco que implica solicitar una nueva determinación sobre la misma muestra utilizando técnicas de Hibridación in situ (HIS). En nuestro centro se realiza HIS cromogénica con técnicas de plata (S-ISH), que determina la relación de HER2/CEP17, así como el número de copias de HER2 por célula. El grupo 3 se considera positivo.

c-Kit (CD117)

Tinción citoplásmica y de membrana.

El nivel de expresión de c-Kit se evaluó según el siguiente esquema (397): 1+: el citoplasma se tiñó con intensidad débil a moderada en el 10% o más de las células neoplásicas; 2+: tinción citoplásmica intensa con o sin tinción de membrana en más del 10% de las células neoplásicas. Cuando no se observaba tinción o estaba presente en menos del 10%, se asignó una puntuación 0. Las puntuaciones 1+ y 2+ se consideraron positivas, frente a la puntuación 0, negativa.

Topoisomerasa II α

Tinción nuclear.

Como se ha descrito en la literatura (299), se consideraron positivos aquellos tumores con inmunotinción nuclear moderada o intensa en más del 5% de las células neoplásicas.

Ki-67

Tinción nuclear.

Se valoró la expresión nuclear de Ki-67, estimando el porcentaje de células positivas, y separando dos grupos, $\leq 20\%$ frente a $>20\%$ de células teñidas (398).

p53

Tinción nuclear.

La expresión de p53 en más del 10% de las células se consideró sobreexpresión. La inmunotinción se consideró negativa (no expresa) cuando el número de células + era $\leq 10\%$ (305).

CDK2

Tinción nuclear.

Se evaluó la inmunotinción del CDK2 en función del porcentaje de células con positividad nuclear en cinco categorías: negativa (0-5% de las células neoplásicas), + (5-25%), ++ (26-50%), +++ (51-75%), y ++++ (76-100%) (193).

CK 5-6

Tinción de membrana.

Para la evaluación de la inmunotinción de CK 5-6, se utilizó un índice que se obtuvo multiplicando la intensidad de tinción (0, no inmunotinción; 1+, tinción débil; 2+ tinción moderada; 3+, tinción fuerte) por la proporción de células neoplásicas teñidas, valoradas entre el 0 y el 100%. Obteniendo un producto comprendido entre 0-300 (227).

Los resultados del estudio inmunohistoquímico se fueron anotando en plantillas diseñadas para tal efecto. Se obtuvo un resultado numérico el cual representaba expresión positiva o negativa en base a lo explicado anteriormente de cada molécula concreta. Se obtuvieron dos resultados de cada inmunotinción correspondiente a las dos muestras extraídas de cada caso. Nosotros valoramos la mayor de ellas.

3.5. Análisis estadístico

Tamaño de muestra

Con el objeto de identificar factores pronósticos independientes de supervivencia hasta recidiva o muerte (los dos eventos en estudio) se realizan sendos modelos multivariantes de Regresión de Cox. El tamaño muestral se determina mediante la regla de Freeman $10 \cdot (k+1)$ (399), donde k es el número de potenciales variables pronósticas que hemos estudiado, explicadas anteriormente, resultando necesario para el estudio de cada evento un mínimo de 220 pacientes, 110 con el evento y otros 110 sin él.

Análisis estadístico

Tras una depuración inicial de los datos se procede a la descripción de los mismos. Las variables cuantitativas se expresan con medias y desviaciones típicas o, en caso de distribuciones asimétricas, con medianas y percentiles P_{25} y P_{75} , y las variables cualitativas con porcentajes. Este resumen se realiza según los dos eventos del estudio, recidiva y muerte.

Para identificar factores pronósticos de supervivencia hasta recidiva o muerte, se realizan sendos modelos multivariantes de Regresión Cox tras análisis univariantes de Cox previos, los cuáles identificarán factores relacionados con supervivencia al 5%. Posteriormente, aquellas variables con significación $< 25\%$ (400) se introducen en el modelo multivariante para la selección final. Este análisis se complementa con gráficos de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier para algunos factores cualitativos interesantes en estudio, testándose las diferencias de supervivencia con el test log-rank.

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico IBM SPSS 22.0 para Windows.

“Siempre se llega a alguna parte si se camina lo bastante”

Alicia en el país de las maravillas

4.Resultados

4.1 Características generales de la muestra:

Toda la información detallada aparece recogida en la *tabla 1*.

Los resultados de mayor interés fueron los siguientes:

Nº Casos: Nuestro estudio recoge una muestra de 234 pacientes (233 mujeres y un hombre).

Edad del diagnóstico: La edad media del paciente en el que se diagnosticó la enfermedad fue de 59,78 años, siendo la máxima 91 años y la mínima 29 años.

Recidiva y Mortalidad: De los 234 pacientes que conforman el estudio, se identificaron 42 recidivas (17,95%) y 27 fallecimientos como consecuencia de la enfermedad (11,54%) durante el período de tiempo que duró el estudio.

Tamaño tumoral: La medida media recogida en nuestros estudios fue de 2,678 cm, con un rango de tamaño que osciló entre 0,7 cm y 14 cm.

Grado de NOTTINGHAM: De las 234 muestras de carcinoma infiltrante de mama de tipo no especial recogidas en nuestro estudio, 54 (23,07%) presentaron un grado 1; 94 (40,17%) grado 2; y 86 (30,75%) grado 3.

Estadio Inicial (clasificado según el sistema TNM). Nuestro estudio recogió 57 pacientes con estadio inicial IA (24,36%), 81 IIA (34,62%), 50 IIB (21,37%), 27 IIIA (11,54%), 5 IIIB (2,14%), y 14 IIIC (5,98%).

Ganglios positivos: Nuestros resultados reflejaron ganglios metastásicos en 93 pacientes (39,74%), y ganglios negativos para metástasis en 141 de ellos (60,25%). El número medio de ganglios positivos para metástasis de carcinoma fue de 11,96 ganglios, con un rango entre 0 y 28 ganglios positivos.

En función del número de ganglios positivos para metástasis, se clasificaron los pacientes en base al estadio N (según el sistema TNM de estadiaje tumoral). De esta manera se obtuvieron 141 casos no metastásicos catalogados como N0 (60,25%), 55 N1 (23,5%), 24 N2 (10,25%), y 14 N3 (5,98%). Estos datos no aportaron información adicional y no fueron incluidos en la tabla.

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
1	0	30/06/1947	56	09/01/2004	02/06/2009	06/07/2012	1,8	2	IA	0	0
2	0	03/11/1918	85	13/01/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,2	2	IIA	12	0
3	0	13/10/1930	73	15/01/2004	06/07/2012	06/07/2012	3,5	3	IIA	2	0
4	0	22/04/1923	80	15/01/2004	01/03/2005	06/07/2012	3	3	IIA	5	0
5	0	07/04/1926	77	28/01/2004		11/02/2007	3	3	IIB	12	1
6	0	27/10/1972	31	28/01/2004	06/07/2012	06/07/2012	2	3	IIA	11	0
7	0	01/11/1924	79	02/02/2004		24/01/2005	2	2	IIA	0	0
8	0	21/10/1943	60	04/02/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIA	10	0
9	0	02/02/1938	66	05/02/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	1	IA	0	0
10	0	02/12/1954	49	24/02/2004	06/07/2012	06/07/2012	2	3	IA	0	0
11	0	31/08/1961	42	25/02/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIB	10	2
12	0	06/03/1947	56	27/02/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,5	2	IIA	0	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
13	0	19/05/1944	59	10/03/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,8	2	IA	14	0
14	0	06/02/1921	83	22/03/2004	02/03/2007	28/01/2010	3	1	IIA	0	0
15	0	10/06/1928	75	24/03/2004	06/07/2012	06/07/2012	2	1	IA	0	0
16	0	20/01/1942	62	31/03/2004	26/04/2006	27/10/2008	5	3	IIB	15	2
17	0	04/08/1960	43	14/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	4	2	IIA	10	0
18	0	01/01/1915	89	15/04/2004	16/09/2007	06/07/2012	3,5	3	IIB	12	1
19	0	01/04/1927	77	21/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	1	0
20	0	25/09/1948	55	22/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,3	1	IA	0	0
21	0	10/07/1930	73	22/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	5	3	IIA	8	0
22	0	27/07/1950	53	23/04/2004	03/11/2005	26/06/2007	6	3	IIIA	23	1
23	0	02/08/1940	63	26/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,5	2	IA	10	0
24	0	15/02/1965	39	26/04/2004	06/07/2012	06/07/2012	3	3	IIIC	24	22

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
25	0	08/12/1930	73	30/04/2004	24/01/2006	06/07/2012	5,5	2	IIIA	24	5
26	0	09/03/1951	53	06/05/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIB	29	3
27	0	24/07/1957	46	12/05/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIB	11	1
28	0	01/02/1934	70	13/05/2004	12/05/2011	06/07/2012	2	2	IA	9	0
29	0	25/01/1942	62	20/05/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IA	0	0
30	0	24/10/1943	60	25/05/2004	10/01/2008	06/07/2012	2	1	IIB	24	0
31	0	01/06/1963	40	27/05/2004	06/07/2012	06/07/2012	5,5	3	IIIB	4	4
32	0	15/04/1938	66	08/06/2004	06/07/2012	06/07/2012	3,5	1	IIA	0	0
33	0	28/01/1969	35	09/06/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,2	2	IIA	9	1
34	0	12/09/1966	37	16/06/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,9	2	IIA	8	0
35	0	16/05/1936	68	22/06/2004	06/07/2012	06/07/2012	2	1	IA	23	0
36	0	01/01/1952	52	23/06/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,9	1	IA	0	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
37	0	11/07/1974	29	30/06/2004	20/11/2006	06/07/2012	3	3	IIIC	12	11
38	0	25/11/1941	62	08/07/2004	22/10/2006	06/07/2012	1,5	3	IA	8	0
39	0	05/03/1949	55	09/07/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IA	0	0
40	0	01/07/1953	51	15/07/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,8	3	IIA	10	0
41	0	25/01/1952	52	29/07/2004	06/07/2012	06/07/2012	4,5	3	IIB	17	2
42	0	03/05/1967	37	30/07/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	13	0
43	0	07/09/1963	40	05/08/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,3	1	IIA	26	0
44	0	03/10/1955	48	06/08/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,8	2	IIA	9	0
45	0	11/08/1928	76	17/08/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,6	3	IIB	15	2
46	0	05/10/1936	67	19/08/2004		27/10/2005	1,8	3	IIIC	28	25
47	0	06/09/1973	30	27/08/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,3	3	IIB	0	0
48	0	12/06/1926	78	27/08/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,3	1	IIB	18	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
49	0	20/02/1956	48	02/09/2004	27/10/2006	12/10/2011	2,1	2	IIIA	18	9
50	0	23/04/1932	72	09/09/2004	06/07/2012	06/07/2012	6	2	IIIC	22	13
51	0	22/11/1922	81	10/09/2004	20/12/2006	06/07/2012	3,3	3	IIIA	17	15
52	0	16/07/1924	80	10/09/2004	14/05/2008	26/02/2009	2,5	3	IIIA	10	3
53	0	01/01/1935	69	23/09/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIA	26	0
54	0	08/02/1952	52	30/09/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,1	2	IA	0	0
55	0	21/01/1953	51	01/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,2	1	IA	0	0
56	0	05/01/1943	61	07/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,2	1	IA	0	0
57	0	11/07/1936	68	14/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,2	2	IIIA	15	6
58	0	26/04/1946	58	15/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,8	2	IIA	12	0
59	0	15/05/1963	41	18/10/2004	31/05/2006	16/12/2009	3,5	3	IIB	8	2
60	0	02/03/1931	73	19/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIB	19	2

Tabla 1

N° Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
61	0	20/11/1956	47	21/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	3,5	2	IIA	15	0
62	0	09/10/1946	58	27/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,3	3	IIIC	19	12
63	0	13/11/1932	71	27/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,7	3	IIA	0	0
64	0	13/10/1923	81	28/10/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	1	IA	0	0
65	0	28/11/1962	41	05/11/2004	06/07/2012	06/07/2012	1,5	1	IA	20	0
66	0	24/12/1919	84	11/11/2004		31/08/2007	2,1	2	IIIB	0	0
67	0	12/12/1959	44	16/11/2004		12/09/2007	5,2	2	IIB	0	0
68	0	31/03/1945	59	18/11/2004	06/07/2012	06/07/2012	0,9	2	IA	23	0
69	0	14/11/1961	43	15/12/2004	06/07/2012	06/07/2012	2,4	2	IIB	16	2
70	0	01/10/1949	55	17/12/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	1	IIA	0	0
71	0	27/02/1922	82	17/12/2004	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IA	4	0
72	0	25/06/1955	49	12/01/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,4	2	IIA	13	1

Tabla 1

N° Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
73	0	01/06/1970	34	13/01/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,3	3	IIA	19	0
74	0	28/05/1940	64	14/01/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,5	3	IIA	23	3
75	0	15/06/1973	31	20/01/2005	08/11/2006	06/07/2012	2,3	2	IIA	28	0
76	0	01/11/1916	88	27/01/2005		11/05/2010	1,6	2	IA	0	0
77	0	01/09/1943	61	28/01/2005	06/07/2012	06/07/2012	1	1	IA	0	0
78	0	07/12/1971	33	09/02/2005	15/11/2007	06/07/2012	2,7	3	IIB	14	3
79	0	18/06/1935	69	09/02/2005	26/09/2008	12/03/2011	5,5	3	IIIA	14	5
80	0	07/12/1938	66	10/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	3,3	3	IIIC	23	14
81	0	20/06/1958	46	16/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,8	2	IIA	14	0
82	0	28/05/1947	57	17/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,3	1	IA	0	0
83	0	20/10/1932	72	21/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	11	0
84	0	11/04/1952	52	22/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	4,9	1	IIB	30	1

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
85	0	14/06/1926	78	24/02/2005	06/07/2012	06/07/2012	5	3	IIA	16	0
86	0	18/03/1933	72	29/03/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,4	3	IIIC	20	12
87	0	19/12/1951	53	30/03/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,6	3	IIB	10	1
88	0	01/10/1944	60	07/04/2005	06/07/2012	06/07/2012	0,7	1	IA	0	0
89	0	10/05/1965	39	20/04/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,7	3	IIIA	11	4
90	0	09/10/1940	64	21/04/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,5	2	IA	17	0
91	0	30/12/1942	62	21/04/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,4	1	IIA	16	0
92	0	12/07/1951	53	11/05/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,6	1	IIB	19	3
93	0	27/04/1946	59	18/05/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,5	2	IIA	9	2
94	0	21/05/1932	72	18/05/2005		16/05/2008	1,7	2	IA	6	0
95	0	27/09/1970	34	20/05/2005	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IIA	12	1
96	0	28/11/1933	71	23/05/2005	14/12/2009	06/07/2012	2,4	1	IIIA	17	9

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
97	0	13/08/1946	58	25/05/2005	06/07/2012	06/07/2012	0,9	3	IIA	12	3
98	0	12/09/1943	61	01/06/2005	27/11/2011	06/07/2012	2,8	3	IIB	14	1
99	0	19/06/1946	58	01/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,2	1	IA	13	0
100	0	08/10/1936	68	09/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,7	3	IIIA	15	5
101	0	19/12/1961	43	15/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IIA	15	0
102	0	05/09/1928	76	16/06/2005	02/08/2006	11/09/2008	2,3	2	IIA	0	0
103	0	23/12/1952	52	16/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IIA	12	1
104	0	08/11/1957	47	29/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	2	3	IIA	14	0
105	0	12/04/1932	73	30/06/2005		24/12/2011	2,2	2	IIA	26	0
106	0	23/05/1935	70	30/06/2005	21/10/2008	06/07/2012	2,4	1	IIA	17	0
107	0	13/03/1930	75	30/06/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,4	2	IIIA	22	4
108	0	08/12/1946	58	14/07/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,2	2	IIA	13	0

Tabla 1

N° Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
109	0	02/06/1966	39	14/07/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,7	3	IIIA	15	5
110	0	24/06/1962	43	14/07/2005	06/07/2012	06/07/2012	3	2	IIIB	16	5
111	0	21/06/1923	82	19/07/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,7	3	IIB	16	3
112	0	08/02/1928	77	21/07/2005	06/07/2012	06/07/2012	3,5	2	IIIB	19	8
113	0	30/03/1966	39	12/08/2005	06/07/2012	06/07/2012	3,5	3	IIA	0	0
114	0	02/07/1924	81	29/08/2005	06/07/2012	06/07/2012	11	3	IIB	31	0
115	0	08/08/1930	75	09/09/2005	06/07/2012	06/07/2012	5,5	3	IIB	0	0
116	0	18/09/1959	45	15/09/2005	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IA	14	0
117	0	27/09/1931	73	23/09/2005	24/10/2007	06/07/2012	2,4	2	IIA	17	0
118	0	10/08/1971	34	17/10/2005	21/09/2006	08/08/2007	2,7	3	IIIC	17	10
119	0	30/08/1972	33	19/10/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,4	3	IIB	31	3
120	0	08/11/1975	29	19/10/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIA	16	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
121	0	13/03/1955	50	20/10/2005	06/07/2012	06/07/2012	3,7	2	IIIA	18	4
122	0	14/07/1924	81	25/10/2005	06/07/2012	06/07/2012	1,9	1	IIA	12	1
123	0	07/09/1946	59	31/10/2005	06/07/2012	06/07/2012	0,8	1	IA	0	0
124	0	08/01/1966	39	09/11/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,7	2	IIA	11	0
125	0	16/11/1948	57	23/11/2005	06/07/2012	06/07/2012	3	2	IIB	13	1
126	0	02/03/1930	75	24/11/2005	06/07/2012	06/07/2012	5,5	3	IIB	16	0
127	0	17/10/1948	57	25/11/2005	06/07/2012	06/07/2012	4,5	3	IIB	24	23
128	0	08/09/1945	60	09/12/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,2	3	IIA	8	0
129	0	09/09/1959	46	16/12/2005	11/12/2009	06/07/2012	5,2	2	IIIA	11	5
130	0	14/01/1926	79	22/12/2005	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	20	0
131	0	05/04/1932	73	23/12/2005	06/07/2012	06/07/2012	3	2	IIIB	13	1
132	0	17/01/1969	36	27/12/2005	06/07/2012	06/07/2012	3,3	3	IIB	15	1

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
133	0	10/08/1928	77	18/01/2006	06/07/2012	06/07/2012	4	3	IIA	7	0
134	0	19/09/1924	81	18/01/2006	06/07/2012	06/07/2012	4	1	IIB	12	0
135	0	14/03/1962	43	19/01/2006	01/09/2011	06/07/2012	2,5	3	IIA	13	0
136	0	18/08/1948	57	26/01/2006	06/07/2012	06/07/2012	1	3	IA	0	0
137	0	28/11/1914	91	26/01/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	0	0
138	0	21/09/1963	42	01/02/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,2	1	IIA	15	0
139	1	18/07/1926	79	16/02/2006	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IA	0	0
140	0	28/01/1948	58	01/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,2	2	IIA	16	1
141	0	18/12/1947	58	01/03/2006		05/06/2010	5	3	IIIA	15	5
142	0	03/10/1952	53	08/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,2	3	IIB	15	2
143	0	04/08/1946	59	13/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,7	2	IIB	0	0
144	0	02/05/1940	65	15/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,3	1	IA	12	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
145	0	01/09/1946	59	17/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,1	3	IIA	22	0
146	0	02/01/1958	48	29/03/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIA	14	0
147	0	12/07/1919	86	05/04/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,5	1	IA	2	0
148	0	01/09/1922	83	18/04/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,252	2	IIIC	31	28
149	0	23/10/1946	59	20/04/2006	06/07/2012	06/07/2012	5,5	2	IIB	13	0
150	0	24/08/1949	56	03/05/2006	06/07/2012	06/07/2012	5,5	3	IIB	11	0
151	0	15/01/1938	68	10/05/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,7	1	IA	14	0
152	0	22/09/1970	35	11/05/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,2	2	IA	10	0
153	0	29/08/1942	63	16/05/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,9	3	IIIA	18	7
154	0	01/01/1945	61	16/05/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,7	2	IIA	14	1
155	0	29/07/1949	56	24/05/2006	03/05/2012	06/07/2012	3	2	IIIC	0	0
156	0	01/11/1959	46	02/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,3	1	IIB	12	2

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
157	0	28/08/1963	42	06/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,9	1	IA	15	0
158	0	05/06/1943	63	06/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	3	3	IIA	20	0
159	0	05/07/1944	61	12/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,2	1	IA	15	0
160	0	06/06/1921	85	19/06/2006	06/07/2012	09/03/2012	2,5	1	IIB	24	1
161	0	18/12/1953	52	26/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,1	2	IIB	15	1
162	0	02/05/1961	45	27/06/2006	06/07/2012	06/07/2012	0,7	2	IIA	21	1
163	0	01/01/1947	59	03/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	0,9	1	IA	18	0
164	0	10/10/1944	61	04/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	0,8	1	IA	0	0
165	0	16/10/1932	73	04/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,3	3	IIB	14	1
166	0	19/05/1935	71	04/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,3	1	IA	17	0
167	0	06/11/1931	74	11/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,7	2	IA	10	0
168	0	01/03/1921	85	11/07/2006	26/10/2010	06/07/2012	4	2	IIA	0	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
169	0	13/05/1967	39	18/07/2006	14/07/2008	30/12/2008	1,5	3	IIIA	25	6
170	0	31/10/1960	45	18/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,4	2	IIB	20	1
171	0	06/01/1933	73	21/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,7	3	IIB	14	2
172	0	01/05/1931	75	28/07/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,8	2	IIB	5	1
173	0	01/01/1948	58	04/08/2006	06/07/2012	06/07/2012	1	3	IIIA	11	4
174	0	02/07/1974	32	11/08/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,2	3	IIIA	13	5
175	0	05/09/1975	31	25/09/2006		13/05/2009	3,5	3	IIB	14	2
176	0	23/04/1936	70	13/11/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,3	1	IIA	9	0
177	0	28/12/1965	40	21/11/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,3	1	IA	2	0
178	0	01/12/1924	81	21/11/2006	06/07/2012	06/07/2012	3	2	IIA	9	0
179	0	31/05/1975	31	21/11/2006	12/05/2009	05/09/2009	2,5	3	IIIA	10	3
180	0	13/06/1922	84	21/11/2006	06/07/2012	06/07/2012	2,6	1	IIA	14	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
181	0	19/08/1941	65	04/12/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,1	1	IA	3	0
182	0	17/04/1949	57	05/12/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,3	3	IA	0	0
183	0	25/10/1926	80	05/12/2006	22/05/2012	06/07/2012	1,7	3	IIA	0	0
184	0	16/05/1963	43	18/12/2006	06/07/2012	06/07/2012	2	1	IIA	17	0
185	0	09/09/1931	75	19/12/2006	06/07/2012	06/07/2012	3	2	IIB	10	1
186	0	15/10/1960	46	22/12/2006	06/07/2012	06/07/2012	1,5	2	IA	10	0
187	0	24/03/1956	50	22/12/2006	27/04/2012	06/07/2012	0,9	2	IA	15	0
188	0	07/02/1955	51	08/01/2007	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IIA	17	0
189	0	21/08/1943	63	15/01/2007	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IIA	0	0
190	0	18/09/1954	52	30/01/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIB	27	3
191	0	01/06/1927	79	26/02/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,1	3	IIA	17	2
192	0	05/03/1944	62	26/02/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,8	1	IA	13	0

Tabla 1

N° Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
193	0	23/02/1933	74	06/03/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,4	2	IIIA	7	4
194	0	14/02/1950	57	13/03/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	1	IIA	0	0
195	0	02/08/1956	50	12/03/2007	06/07/2012	06/07/2012	4,5	2	IIIA	21	3
196	0	01/04/1951	55	20/03/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	2	IIB	13	1
197	0	09/10/1964	42	23/03/2007	15/06/2011	06/07/2012	5,2	2	IIIA	15	7
198	0	08/04/1950	56	26/03/2007	06/07/2012	06/07/2012	0,9	1	IA	16	0
199	0	19/06/1945	61	02/04/2007	06/07/2012	06/07/2012	0,7	1	IIA	0	0
200	0	05/04/1933	73	02/04/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	1	IIA	14	0
201	0	18/12/1938	68	16/04/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,8	3	IIA	2	0
202	0	03/01/1962	45	02/05/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,7	2	IA	17	0
203	0	01/02/1953	54	07/05/2007	06/07/2012	06/07/2012	5,5	2	IIIC	21	9
204	0	16/01/1934	73	07/05/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,5	1	IA	0	0

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
205	0	25/11/1944	62	24/05/2007	06/07/2012	06/07/2012	3	3	IIA	0	0
206	0	08/03/1941	66	01/06/2007		06/01/2009	2,5	3	IIA	0	0
207	0	02/11/1944	62	14/06/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,3	2	IA	0	0
208	0	13/05/1934	73	22/06/2007	10/06/2011	24/09/2011	1,3	2	IA	0	0
209	0	02/08/1951	55	21/06/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIA	1	0
210	0	07/05/1953	54	06/07/2007	11/07/2010	06/07/2012	2,3	3	IIB	17	1
211	0	19/11/1935	71	05/07/2007	14/10/2010	06/07/2012	1,7	3	IIIA	13	2
212	0	26/05/1941	66	13/07/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,4	2	IA	0	0
213	0	28/08/1959	47	19/07/2007	06/07/2012	06/07/2012	3,8	2	IIA	0	0
214	0	14/12/1927	79	19/07/2007	27/07/2010	24/09/2010	3,5	2	IIB	20	2
215	0	21/12/1972	34	03/08/2007	06/07/2012	06/07/2012	2	2	IIA	3	0
216	0	29/08/1943	63	17/08/2007	30/04/2009	21/12/2009	5	2	IIIC	25	12

Tabla 1

Nº Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
217	0	20/04/1944	63	06/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,3	2	IA	14	0
218	0	25/12/1952	54	06/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	4	3	IIB	14	2
219	0	25/10/1969	37	13/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,6	3	IIIC	24	11
220	0	11/04/1946	61	14/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	1	2	IA	0	0
221	0	23/09/1942	64	17/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,3	2	IIA	29	1
222	0	01/02/1931	76	21/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	1	IIIA	19	4
223	0	24/10/1931	75	28/09/2007	06/07/2012	06/07/2012	14	3	IIIC	18	18
224	0	14/09/1946	61	04/10/2007	03/11/2010	06/07/2012	2,2	3	IIA	8	0
225	0	17/12/1953	53	09/10/2007		25/03/2008	3	3	IIIA	0	0
226	0	25/01/1930	77	11/10/2007	06/07/2012	06/07/2012	3,5	1	IIA	0	0
227	0	01/02/1929	78	11/10/2007	06/07/2012	06/07/2012	3,1	3	IIA	2	0
228	0	03/11/1929	77	15/10/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,4	1	IA	0	0

Tabla 1

N° Caso	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad al Diagnóstico	Fecha Recepción	Fecha de Recidiva	Fecha Mortalidad	Tamaño	Nottingham	Estadio Inicial	Ganglios totales	Ganglios positivos
229	0	08/06/1942	65	24/10/2007	06/07/2012	06/07/2012	3	1	IIA	5	0
230	0	08/11/1936	71	22/11/2007	06/07/2012	06/07/2012	1,2	1	IA	10	0
231	0	05/05/1942	65	29/11/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,5	3	IIB	12	4
232	0	01/09/1948	59	29/11/2007	28/05/2009	30/03/2010	1,6	3	IIIA	0	0
233	0	17/05/1947	60	30/11/2007	06/07/2012	06/07/2012	2,3	2	IIB	11	0
234	0	11/09/1958	49	13/12/2007	06/07/2012	06/07/2012	2	3	IIB	10	1

4.2. Resultados Inmunohistoquímicos:

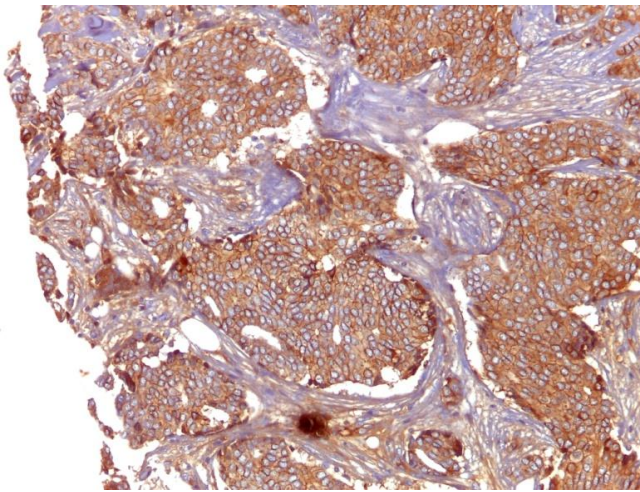
A. Expresión de cada uno de los anticuerpos:

E-cadherina:

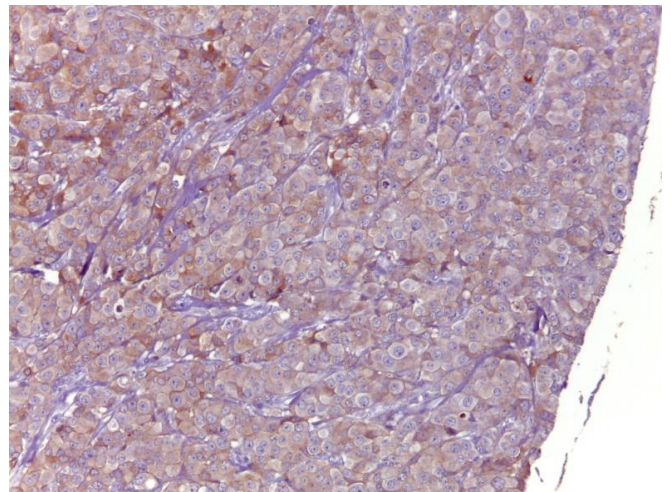
Tinción de membrana.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 181 (77,4%) fueron e-cadherina (+), y 53 (22,6%) fueron e-cadherina (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 32 (76,19%) fueron e-cadherina (+) y 10 (23,8%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 21 (77,7%) fueron e-cadherina (+), y 6 (22,3%) presentaron tinción negativa.

Caso n°36 (10, Positivo) 20x



Caso n° 11 (4, Negativo) 20x

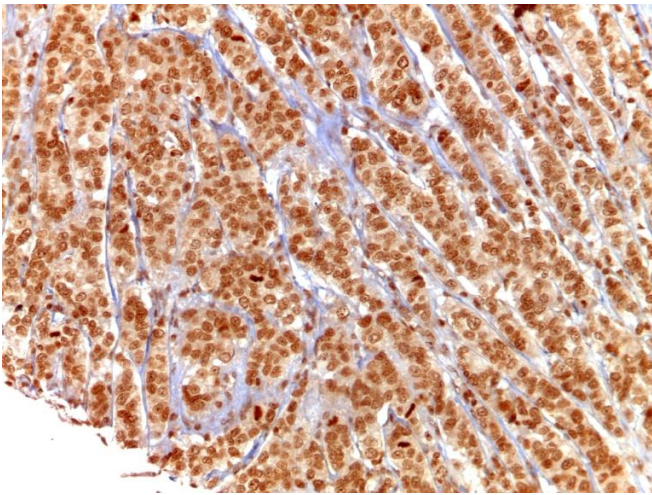


Twist:

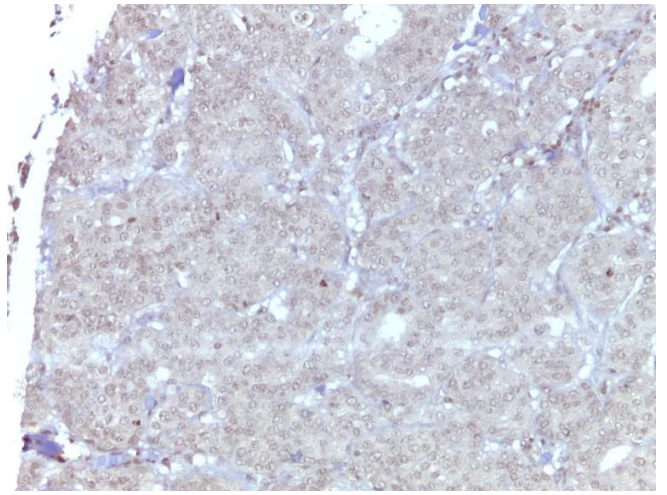
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 22 (9,3%) fueron twist (+), y 212 (90,7%) fueron twist (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 3 (7,14%) fueron twist (+) y 39 (92,86%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 2 (7,41%) fueron twist (+), y 25 (92,6%) presentaron tinción negativa.

Caso n°133 (6, Positivo) 20x



Caso n°40 (4, Negativo) 20x

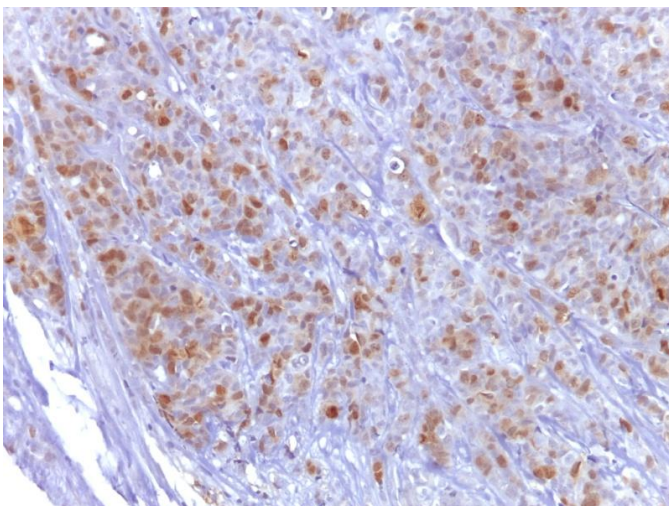


Survivina:

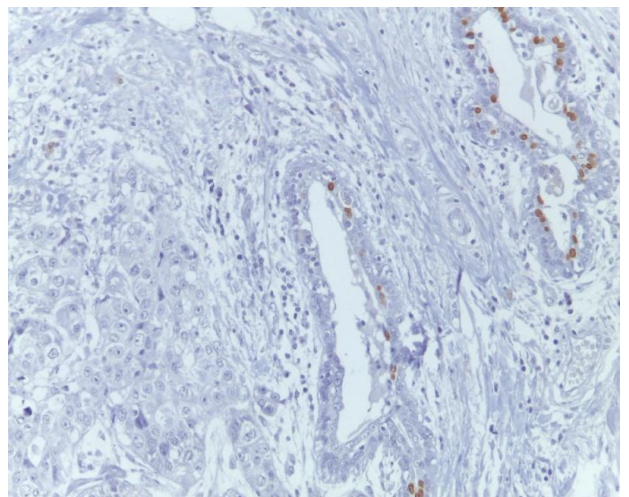
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 100 (42,9%) fueron survivina (+), y 134 (57,1%) fueron survivina (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 19 (45,23%) fueron survivina (+) y 23 (54,76%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 12 (44,4%) fueron survivina (+), y 15 (55,6%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 22 (9, Positivo) 20x



Caso n° 68 (0, Negativo) 20x

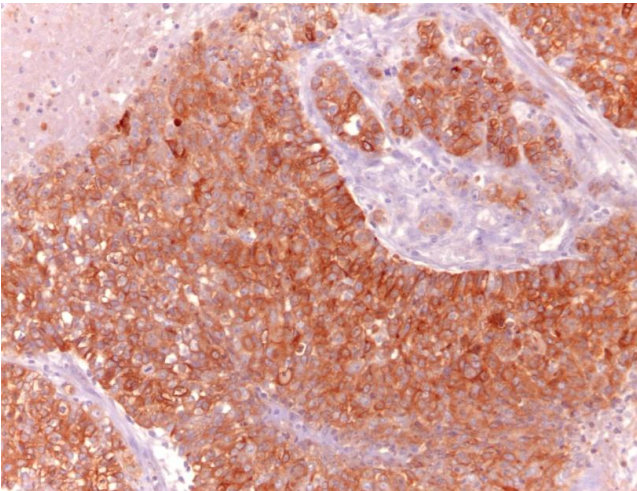


CD117:

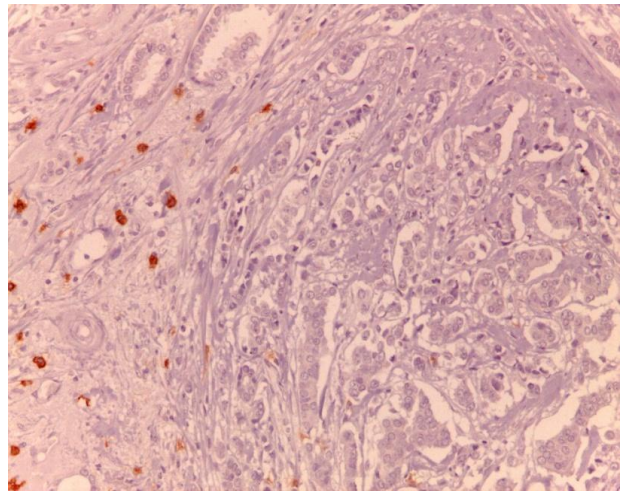
Tinción de membrana y citoplasma.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 25 (10,65%) fueron CD117 (+), y 209 (89,35%) fueron CD117 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 5 (11,9%) fueron CD117 (+) y 37 (88,09%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 1 (3,7%) fueron CD117 (+), y 26 (96,3%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 150 (2+, Positivo) 20x



Caso n° 19 (0, Negativo)

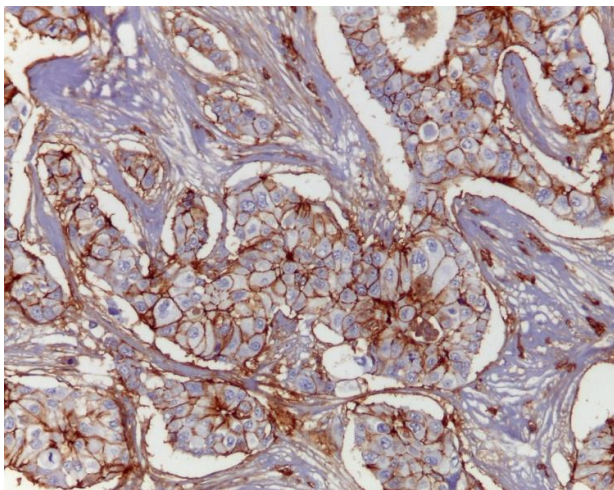


CD44:

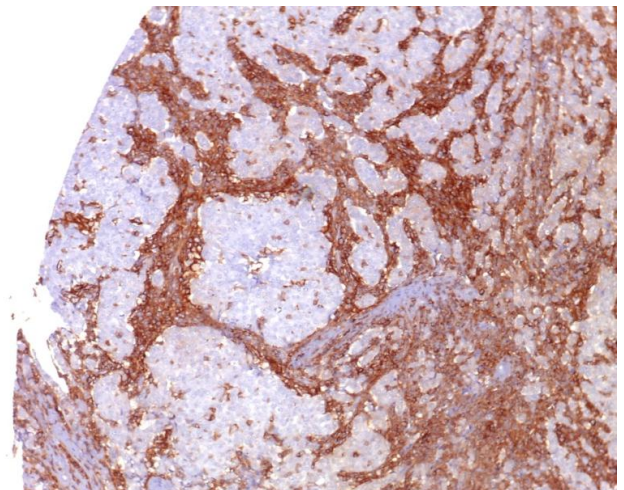
Tinción de membrana.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 126 (53,7%) fueron CD44 (+), y 98 (46,3%) fueron CD44 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 23 (54,76%) fueron CD44 (+) y 19 (45,24%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 12 (44,4%) fueron CD44 (+), y 15 (55,6%) presentaron tinción negativa.

Caso n°3 (3, Positivo) 20x



Caso n° 28 (0, Negativo) 20x

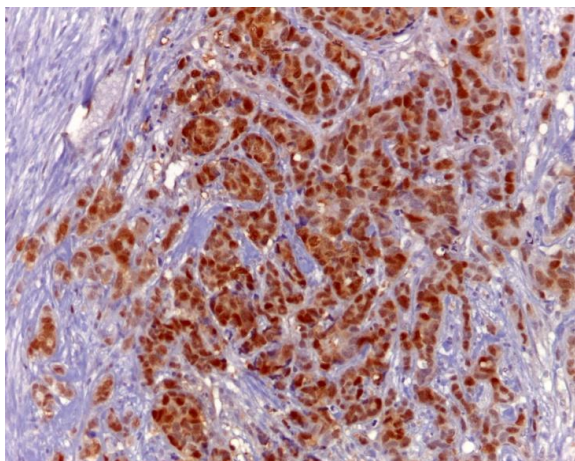


CDK2:

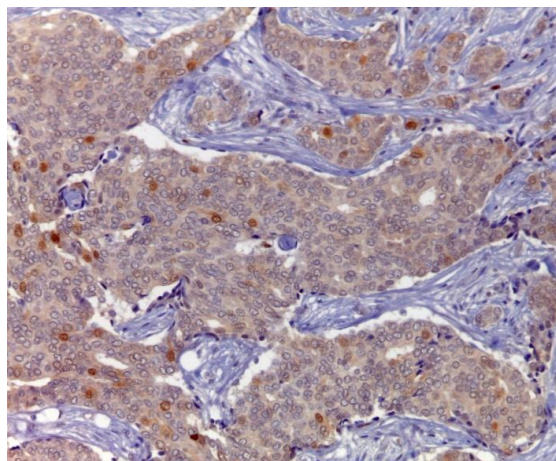
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, se organizaron en cinco categorías en base al porcentaje de tinción, con los siguientes resultados: categoría 0: 67 (28,6%), 1: 181 (54,8%), 2: 28 (11,9%), 3: 6 (2,4%) y 4: 6 (2,4%). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 13 (30,95%) fueron de grado 0, 22 (52,38%) de grado 1, 5 (11,9%) de grado 2, 1 (2,38%) de grado 3 y 1 (2,38%) de grado 4. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 10 (37,03%) fueron de grado 0, 12 (44,4%) de grado 1, 3 (11,1%) de grado 2, 0 (0%) de grado 3 y 2 (7,41%) de grado 4.

Caso n° 22 (85%, Positivo) 20x



Caso n° 36 (3, Negativo) 20x

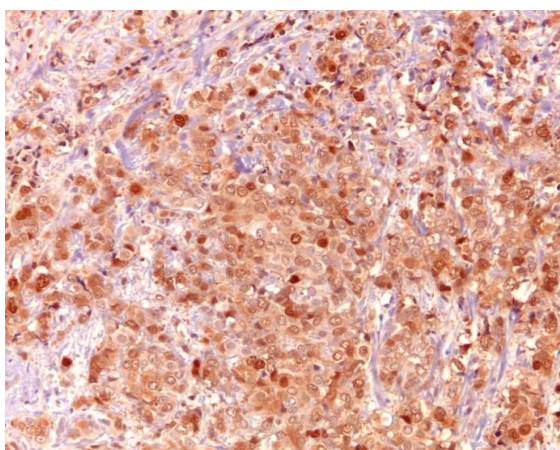


RKIP:

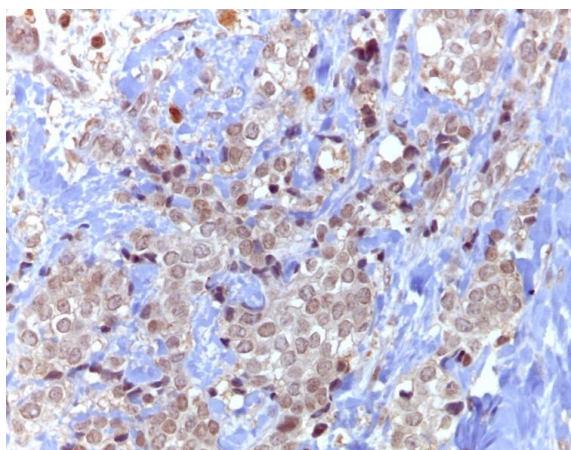
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 181 (77,4%) fueron RKIP (+), y 53 (22,6%) fueron RKIP (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 32 (76,19%) fueron RKIP (+) y 10 (23,8%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 21 (77,7%) fueron RKIP (+), y 6 (22,3%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 138 (6, Positivo intenso) 20x



Caso n° 11 (4, Positivo débil) 20x

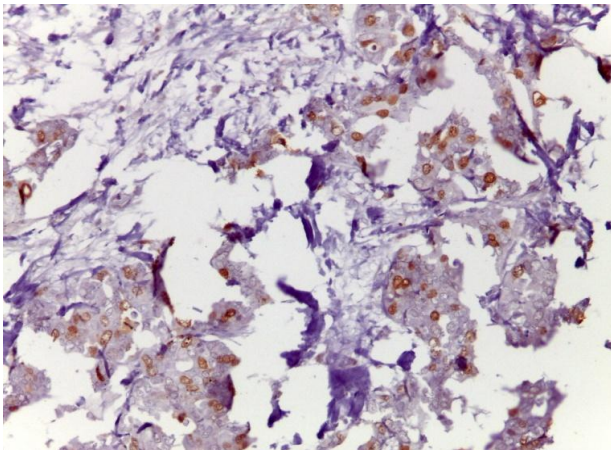


TOP2A:

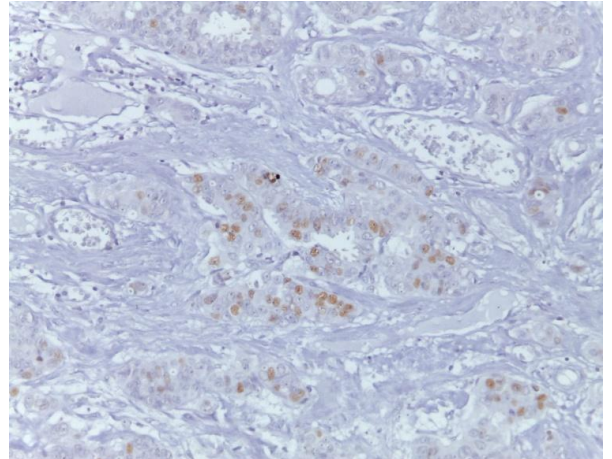
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 40 (17,25%) fueron TOP2A (+), y 194 (87,75%) fueron TOP2A (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 4 (9,52%) fueron TOP2A (+) y 38(90,47%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 4 (14,81%) fueron TOP2A (+), y 15 (55,6%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 130 (25, Positivo) 20x



Caso n° 7 (20, Positivo) 20x

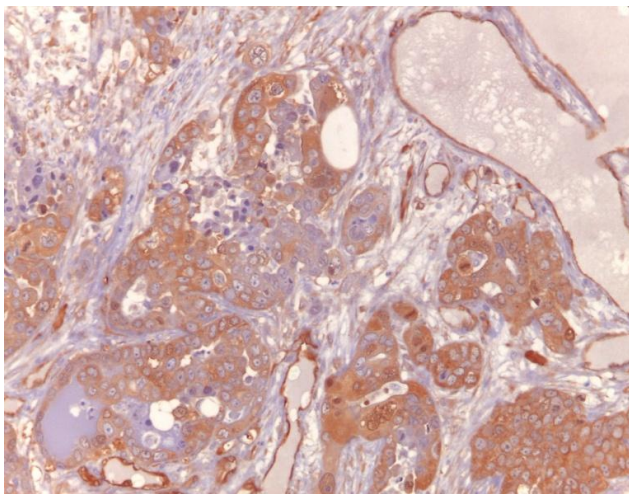


Fascina:

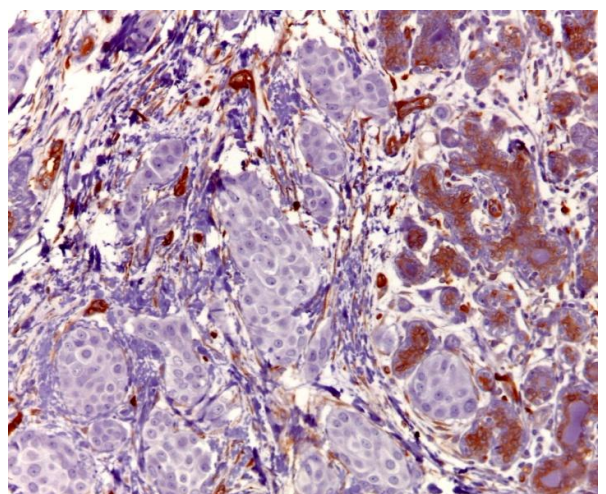
Tinción de membrana.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 28 (12,1%) fueron fascina (+), y 206 (87,9%) fueron fascina (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 6 (14,28%) fueron fascina (+) y 36 (85,71%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 3 (11,1%) fueron fascina (+), y 24 (88,9%) presentaron expresión negativa.

Caso n° 21 (8, Positivo) 20x



Caso n° 146 (0, Negativo)

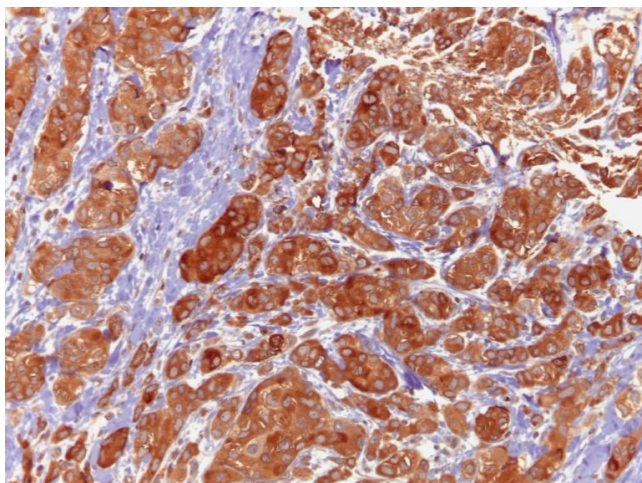


ABCG2:

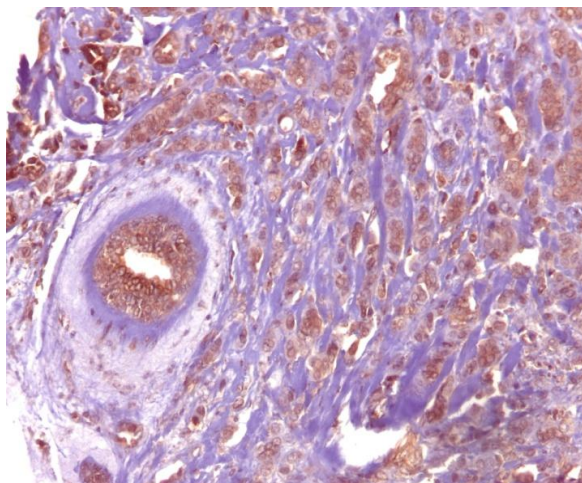
Tinción citoplásmica.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 233 (99,75%) fueron ABCG2 (+), y 1 (0,25%) fueron ABCG2 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 42 (100%) fueron ABCG2 (+). A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 27 (100%) presentaron expresión positiva.

Caso n° 89 (12, Positivo) 20x



Caso n° 56 (4, Positivo) 20x

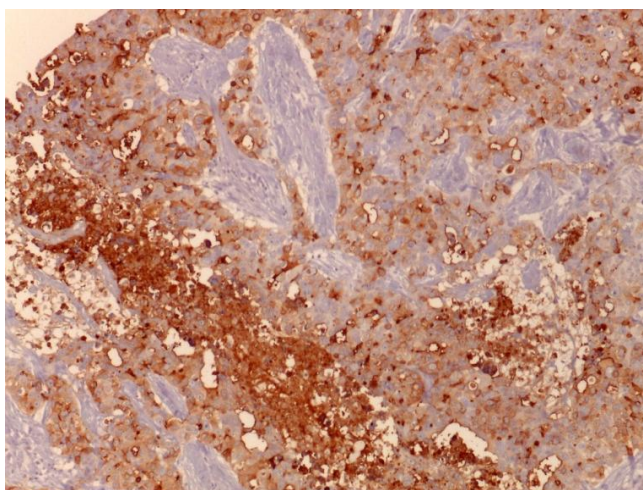


CK 5/6:

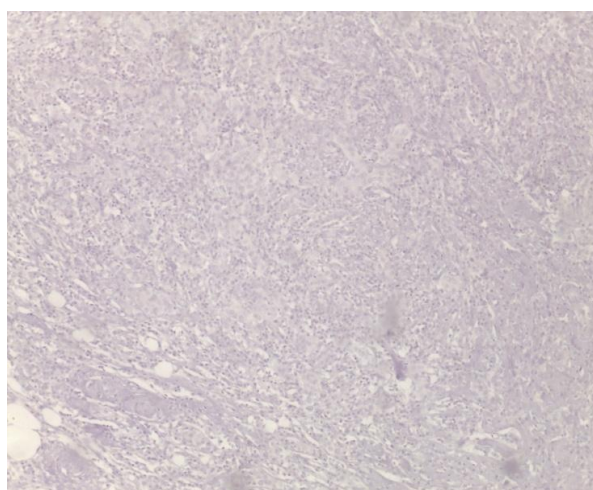
Tinción de membrana.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 23 (9,75%) fueron CK5/6 (+), y 201 (90,25%) fueron CK5/6 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 6 (14,28%) fueron CK5/6 (+) y 36 (85,71%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 4 (14,82%) fueron CK5/6 (+), y 23 (85,18%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 21 (270/300, Positivo) 20x



Caso n° 16 (0, Negativo) 20x

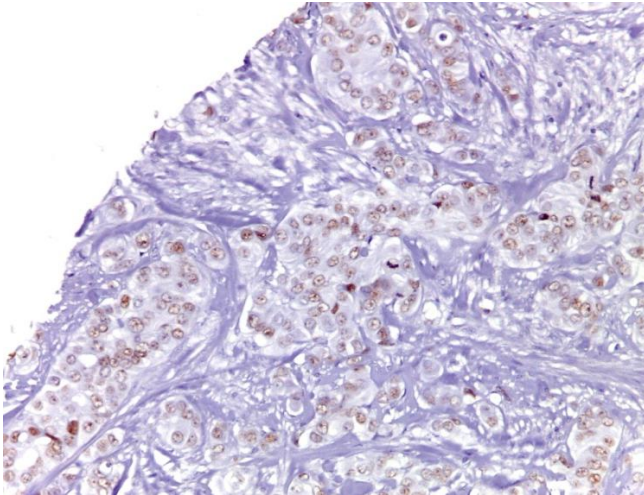


FOXA1:

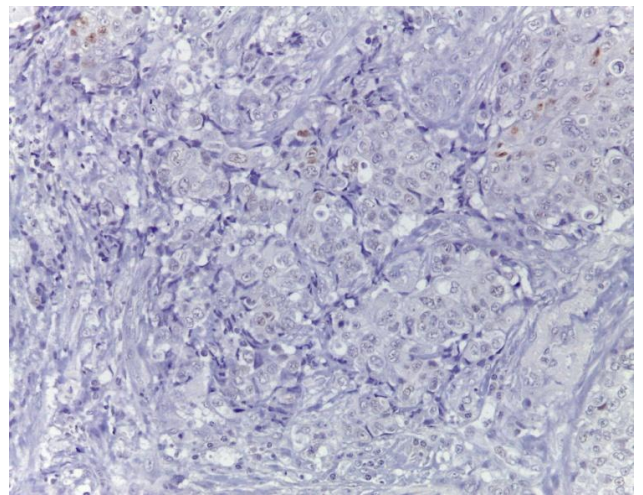
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 213 (91,2%) fueron FOXA1 (+), y 21 (8,8%) fueron FOXA1 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 37 (88,09%) fueron FOXA1 (+) y 5 (11,9%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 24 (88,9%) fueron FOXA1 (+), y 3 (11,1%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 31 (24, Positivo) 20x



Caso n° 10 (0, Negativo) 20x

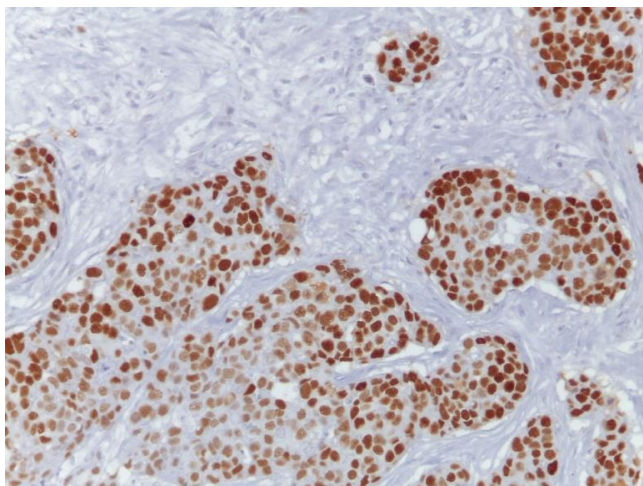


p53:

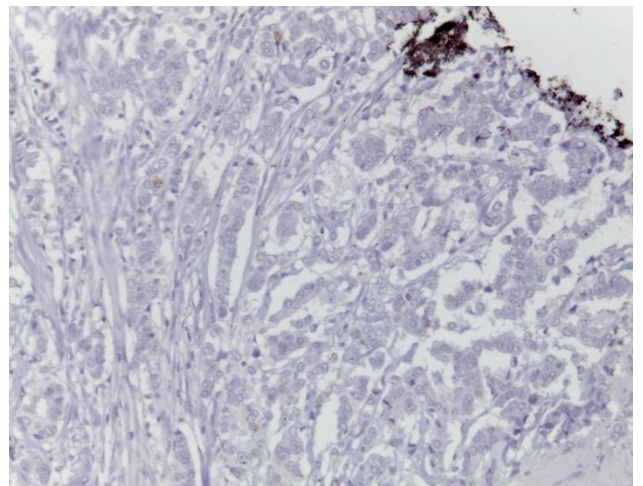
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 54 (23,1%) fueron p53 (+), y 180 (76,9%) fueron p53 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 12 (28,57%) fueron p53 (+) y 30 (71,43%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 7 (25,93%) fueron p53 (+), y 20 (74,07%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 18 (95%, Positivo) 20x



Caso n° 19 (0%, Negativo) 20x

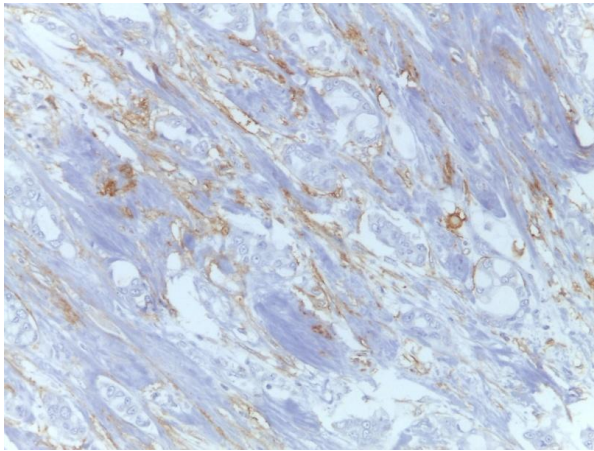


CD10:

Tinción de membrana de células estromales adyacentes a la neoplasia.

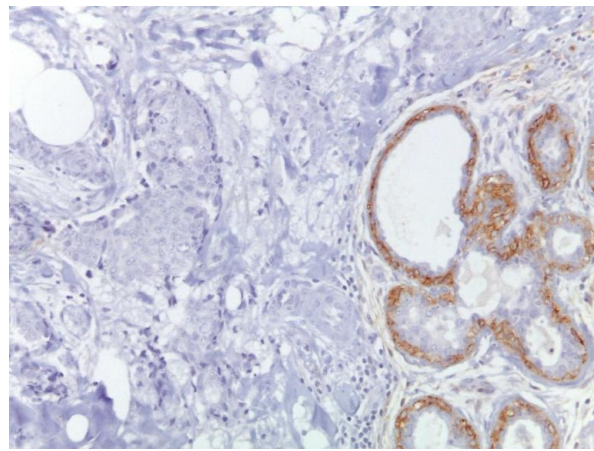
De los 234 pacientes que componen el estudio, 179 (76,5%) fueron CD10 (+), y 55 (23,5%) fueron CD10 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 30 (71,43%) fueron CD10 (+) y 12 (28,57%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 21 (77,7%) fueron CD10 (+), y 6 (22,3%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 14 (60, Positivo) 20x



Caso n° 17 (0, Negativo)

Control Interno mama normal. 20x

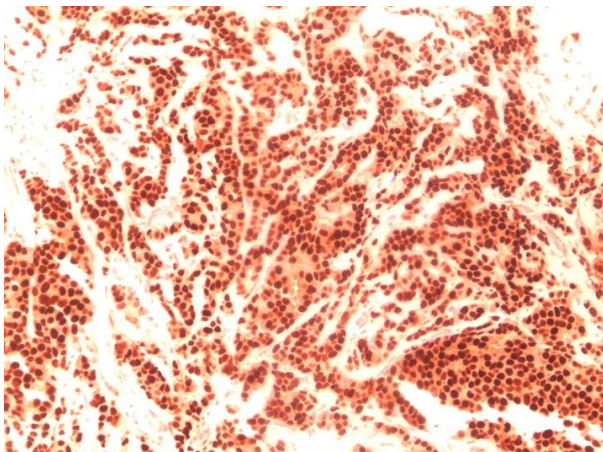


Estrógenos:

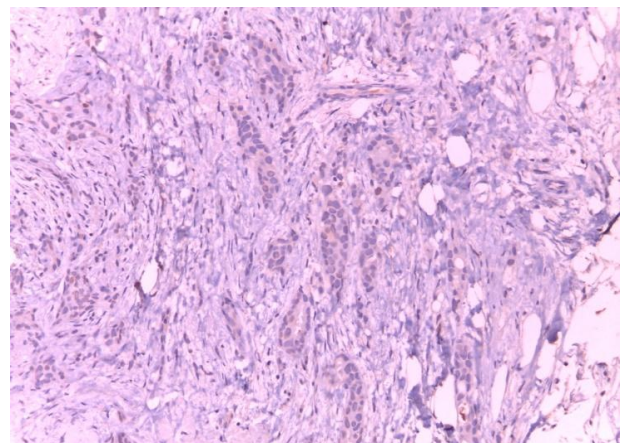
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 175 (74,75%) fueron estrógenos (+), y 59 (25,25%) fueron estrógenos (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 28 (66,6%) fueron estrógenos (+) y 14 (33,3%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 16 (59,26%) fueron estrógenos (+), y 11 (40,74%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 68 (8, Positivo) 20x



Caso 37 (0, Negativo) 20x



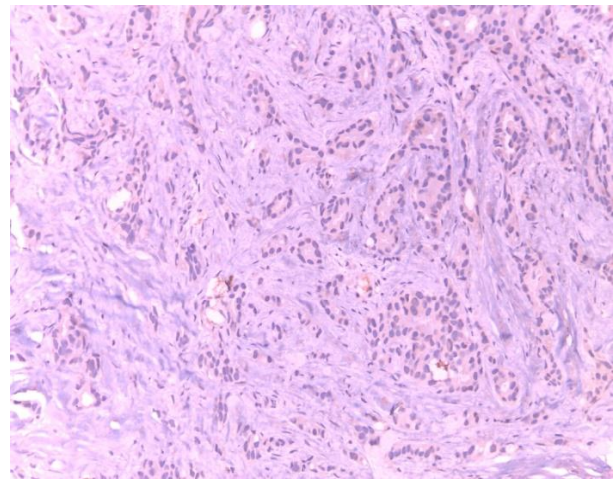
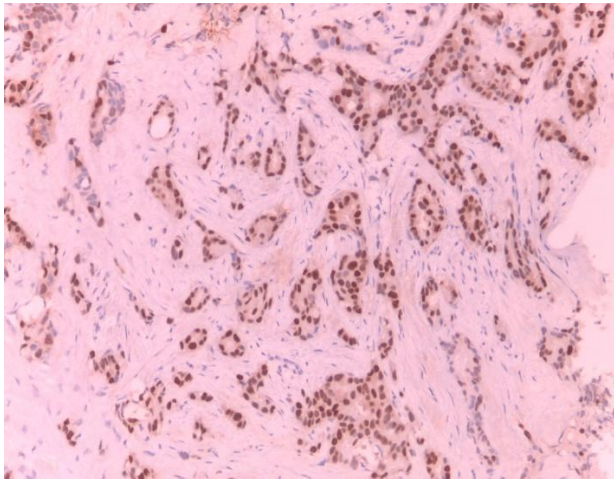
Progesterona:

Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 167 (71,45%) fueron progesterona (+), y 67 (28,55%) fueron progesterona (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 26 (61,9%) fueron progesterona (+) y 16 (38,09%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 19 (70,37%) fueron progesterona (+), y 8 (29,63%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 43 (8, Positivo) 20x

Caso n° 67 (0, Negativo) 20x



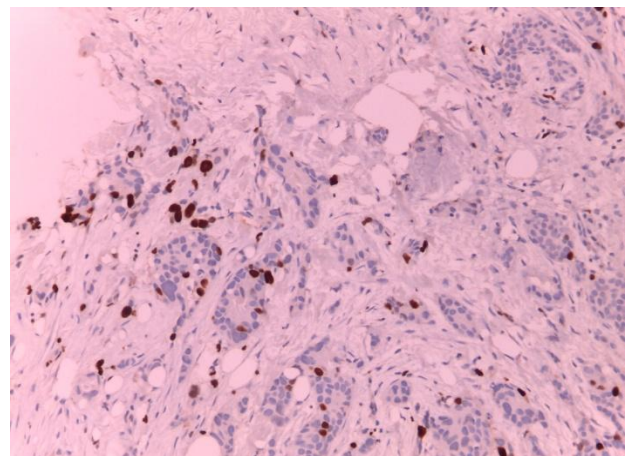
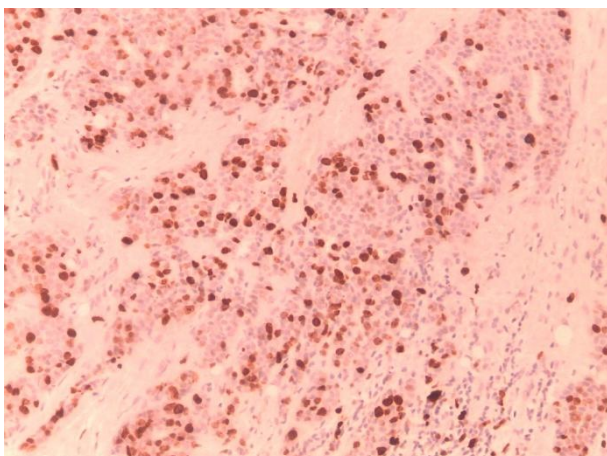
Ki67:

Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 162 (69,3%) fueron Ki67 (+), y 72 (30,7%) fueron Ki67 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 33 (78,57%) fueron Ki67 (+) y 9 (21,43%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 18 (66,6%) fueron Ki67 (+), y 9 (33,4%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 59 (60%, Positivo) 20x

Caso n° 42 (10%, Negativo) 20x

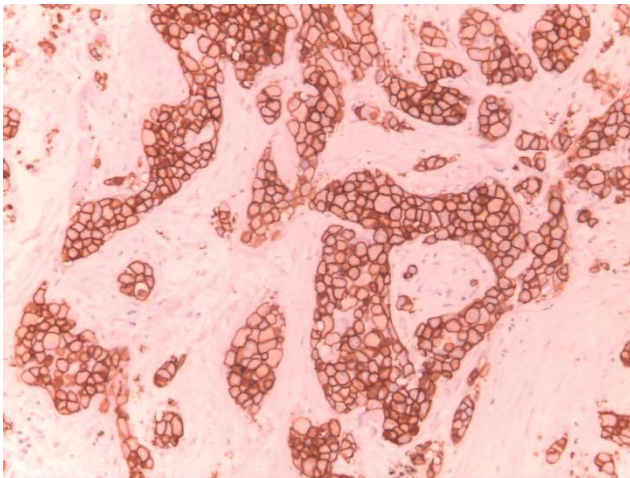


HER-2:

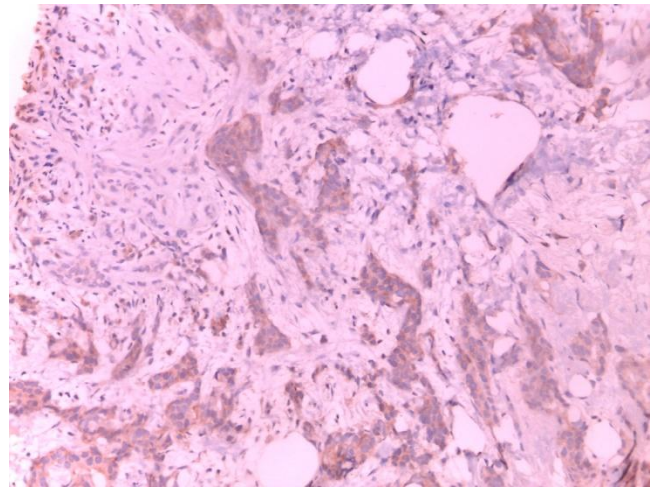
Tinción de membrana.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 51 (21,9%) fueron HER-2(+), y 183 (78,1%) fueron HER-2 (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 9 (21,43%) fueron HER-2 (+) y 33 (78,57%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 5 (18,52%) fueron HER-2 (+), y 22 (81,48%) presentaron tinción negativa.

Caso n°70 (3+, Positivo) 20x



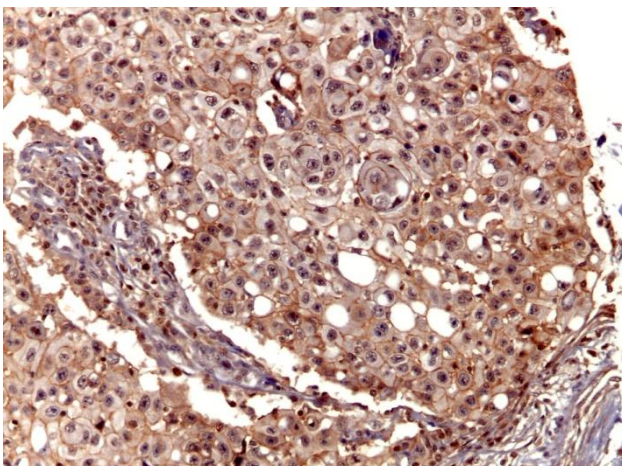
Caso n° 80 (1+, Negativo) 20x



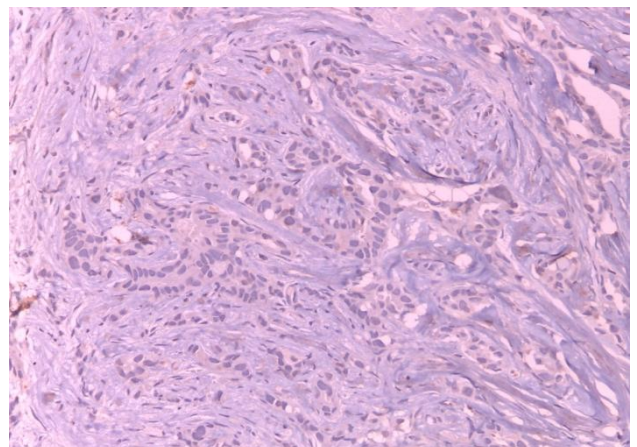
CXCR4c: Tinción de citoplasma.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 169 (72,4%) fueron CXCR4c (+), y 65 (27,6%) fueron CXCR4c (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 31 (73,8%) fueron CXCR4c (+) y 11 (26,19%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 21 (77,7%) fueron CXCR4c (+), y 6 (22,3%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 223 (2, Positivo) 20x



Caso n° 94 (1, Negativo) 20x

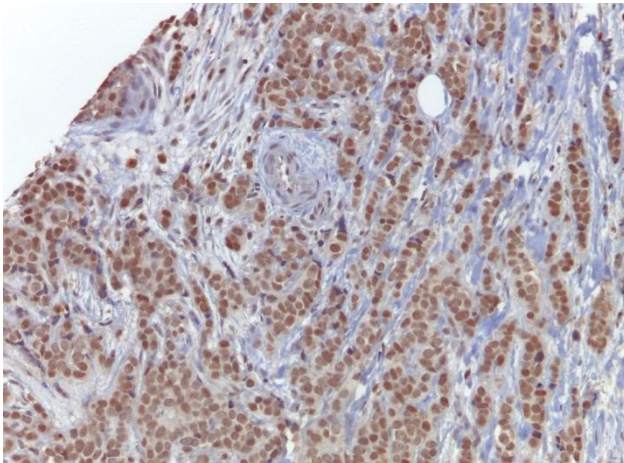


CXCR4n:

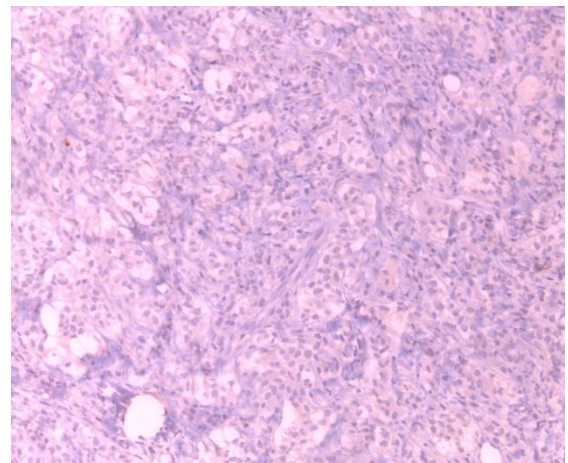
Tinción nuclear.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 56 (23,9%) fueron CXCR4n (+), y 178 (76,1%) fueron CXCR4n (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 11 (26,19%) fueron CXCR4n (+) y 31 (73,8%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 6 (22,3%) fueron CXCR4n (+), y 21 (77,7%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 34 (1, Positivo) 20x



Caso n°154 (0, Negativo) 20x

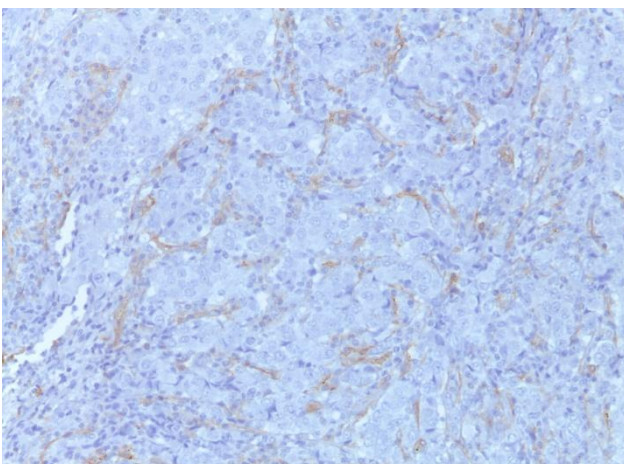


Caveolina:

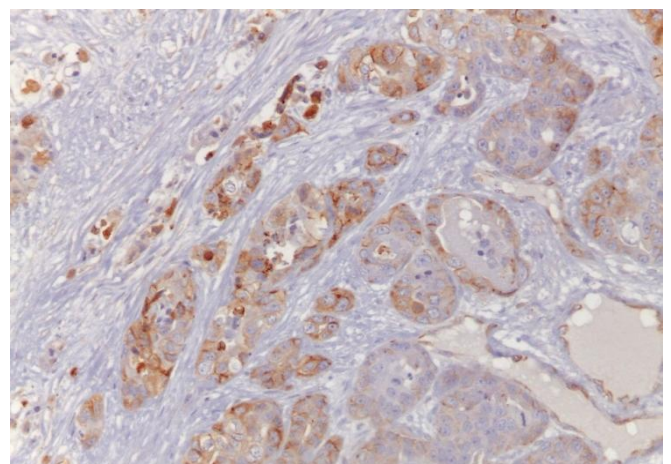
Tinción de membrana de las células estromales adyacentes a la neoplasia.

De los 234 pacientes que componen el estudio, 122 (52,35%) fueron caveolina (+), y 112 (47,65%) fueron caveolina (-). De los 42 pacientes que registraron recidiva de la enfermedad, 21 (50%) fueron caveolina (+) y 21 (50%) fueron negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo de estudio, 15 (55,5%) fueron caveolina (+), y 12 (44,5%) presentaron tinción negativa.

Caso n° 28 (2, Positivo) 20x



Caso n° 21 (0, Negativo) 20x
(Marcaje Epitelial)



B. Perfil molecular:

Los 234 pacientes que compusieron el estudio, se clasificaron en las siguientes categorías: luminal A: 61 (26,15%), luminal B: 80 (34,25%), HER2: 51 (21,65%) y triple negativo (basal-like): 42 (17,9%). De los 42 pacientes que presentaron recidiva de la enfermedad, 9 (21,43%) eran luminal A, 15 (35,71%) eran luminal B, 8 (19,04%) eran HER2, y 10 (23,8%) eran triple negativo. A su vez, de los 27 pacientes que fallecieron durante el tiempo del estudio, 5 (18,52%) fueron luminal A, 8 (29,63%) fueron luminal B, 5 (18,52%) fueron HER2, y 9 (33,4%) fueron triple negativo.

En la *tabla 2.1*, se detallan los resultados de la evaluación en cada uno de los Anticuerpos estudiados. El resultado numérico de cada anticuerpo representa la expresión positiva o negativa, según lo descrito en los apartados de Material y Métodos.

En la *tabla 2.2* y *tabla 2.3*, se recoge la expresión inmunohistoquímica de cada antígeno en relación de la recidiva o mortalidad respectivamente.

Resultados Inmunohistoquímicos:

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
1	12	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
2	10	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
3	8	4	0	0	3	10	1	5	2	0	0
4	6	4	1	1	1	30	2	4	1	0	4
5	12	4	4	0	2	80	4	5	2	0	4
6	4	4	2	0	0	30	2	4	1	0	0
7	8	4,5	2	0	0	15	1	5	2	20	0
8	8	3	2	0	0	3	0	4	1	0	0
9	8	6,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
10	4	4	1	1	0	30	2	4	1	0	4
11	4	4,5	1	0	2	40	2	4	1	10	0
12	12	6	1	0	0	40	2	5	2	0	0
13	10	5,5	2	0	3	60	3	5	2	7	0
14	8	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
15	8	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
16	12	5	1	0	3	10	1	4	1	0	0
17	8	4	0	0	1	3	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
18	5,5	4,5	2	1	3	55	3	4	1	0	8
19	0	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
20	10	6	1	0	3	10	1	5	2	0	0
21	3,5	5	4	0	1	60	3	4	1	7	8
22	8	5	9	0	0	85	4	5	2	10	0
23	4	4	0	0	0	10	1	4	1	0	0
24	6	4,5	1	0	0	30	2	5	2	0	0
25	10	4,5	0	0	0	10	1	6	2	0	0
26	8	4,5	0	0	0	3	0	6	2	0	0
27	10	4	0	0	2	40	2	5	2	0	0
28	6	3,5	0	0	0	10	1	5	2	0	0
29	10	4,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
30	10	4,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
31	8	5	2	0	0	10	1	5	2	7	0
32	8	4	0	0	0	3	0	4	1	0	0
33	12	4	1	0	0	30	2	5	2	0	0
34	12	6,5	2	0	2	10	1	4	1	10	0
35	4	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
36	10	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
37	12	4	6	0	1	10	1	5	2	0	0
38	10	2	0	0	2	10	1	4	1	0	0
39	0	4	0	0	2	10	1	6	2	0	0
40	8	4	1	0	0	10	1	5	2	0	0
41	8	4	0	0	3	10	1	5	2	0	0
42	12	5	2	0	1	30	2	6	2	0	0
43	8	4	0	2	2	10	1	6	2	0	0
44	8	4	2	0	0	10	1	6	2	0	0
45	8	5	1	0	0	30	2	5	2	0	0
46	8	4,5	1	0	1	30	2	5	2	0	0
47	4	4	0	0	2	10	1	5	2	0	0
48	8	4	1	0	2	3	0	6	2	0	0
49	12	5	0	0	0	40	2	6	2	0	0
50	4	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
51	4	2	0	0	3	10	1	5	2	0	4
52	4	5	0	0	0	10	1	5	2	0	0
53	4	2	0	0	0	10	1	4	1	0	4
54	12	5	2	0	2	60	3	5	2	0	0
55	12	6,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
56	4	4,5	0	0	0	20	1	5	2	0	0
57	4	4,5	0	0	2	3	0	5	2	0	0
58	8	5	2	1	0	20	1	5	2	0	4
59	12	4	1	0	0	10	1	4	1	0	0
60	8	4	1	1	0	3	0	5	2	0	0
61	8	4	1	0	1	20	1	5	2	0	0
62	12	5	6	2	0	82	4	5	2	10	0
63	0	5	2	1	0	10	1	5	2	10	0
64	8	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
65	8	6	6	0	0	10	1	5	2	0	0
66	4	4	0	0	0	10	1	4	1	0	0
67	4	5	1	0	0	30	2	5	2	0	0
68	4	4	0	0	0	3	0	4	1	0	0
69	4	4,5	0	0	1	3	0	4	1	0	0
70	6	4	1	0	0	30	2	4	1	10	0
71	12	5,5	2	0	2	3	0	5	2	0	0
72	4	5	0	1	2	10	1	4	1	0	0
73	8	4	6	0	0	30	2	5	2	0	0
74	8	4	3	0	0	20	1	5	2	10	1

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
75	4	4,5	1	0	0	15	1	5	2	7	0
76	4	5	1	0	0	3	0	4	1	0	0
77	8	4	2	0	1	3	0	5	2	0	0
78	4	4,5	2	0	2	40	2	5	2	0	0
79	9	4,5	3	0	0	20	1	5	2	15	0
80	10	3,5	3	0	1	20	1	5	2	15	0
81	10,5	6,5	8	1	2	10	1	6	2	20	0
82	8	4	1	0	3	3	0	5	2	0	0
83	10	4	0	0	0	10	1	4	1	0	0
84	8	4,5	0	0	1	3	0	6	2	0	0
85	3,5	4,5	1	0	0	30	2	5	2	0	0
86	10	4	2	0	0	10	1	5	2	10	0
87	6	4	2	1	2	20	1	5	2	15	0
88	12	5,5	0	0	3	3	0	5	2	0	0
89	10	4	0	1	0	10	1	4	1	10	0
90	4	4	1	0	1	20	1	5	2	10	0
91	1	6	2	0	3	10	1	6	2	0	0
92	6	4,5	0	0	3	3	0	6	2	0	0
93	8	4,5	4	0	2	60	3	5	2	15	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
94	12	6	0	0	1	3	0	5	2	0	0
95	6	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
96	5	5	0	0	0	3	0	6	2	0	0
97	6	4	1	0	2	10	1	5	2	0	0
98	12	6	2	0	1	10	1	5	2	0	2
99	7	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
100	8	4,5	9	1	1	30	2	4	1	20	1
101	12	5	0	0	3	3	0	5	2	0	0
102	10	3	0	0	0	3	0	5	2	0	0
103	10	4,5	1	0	0	10	1	5	2	10	0
104	10	4	2	2	0	30	2	5	2	15	0
105	8	3,5	0	0	2	3	0	5	2	0	2
106	8	4,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
107	8	5	0	0	0	10	1	5	2	0	0
108	8	4	0	0	1	30	2	5	2	0	0
109	4	2	0	0	0	10	1	4	1	10	0
110	12	6	3	0	1	10	1	5	2	0	2
111	10	6,5	0	0	2	30	2	6	2	0	0
112	6	2	0	0	3	2	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
113	6	2	2	2	2	10	1	5	2	0	4
114	6	4	1	0	1	20	1	5	2	0	8
115	8	3,5	0	0	0	20	1	5	2	0	0
116	6	4	1	0	2	10	1	5	2	0	0
117	6	4	0	0	1	10	1	5	2	0	0
118	8	4	0	0	0	3	0	5	2	0	2
119	4	4	1	1	0	3	0	5	2	0	0
120	6	4,5	0	0	0	10	1	4	1	0	0
121	8	5	1	0	0	10	1	5	2	20	0
122	8	6	0	0	2	3	0	5	2	7	0
123	12	6	0	0	0	3	0	5	2	3	2
124	4	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
125	10	6	0	0	0	3	0	5	2	0	0
126	12	6	0	0	0	20	1	6	2	0	0
127	4	4	0	0	0	10	1	4	1	0	0
128	4	5,5	0	0	0	3	0	4	1	0	2
129	8	3,5	1	0	2	10	1	5	2	0	0
130	6	4	0	0	0	10	1	5	2	25	0
131	7	4	1	0	3	10	1	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
132	7	4	0	0	0	3	0	4	1	0	0
133	8	6	2	0	0	30	2	5	2	15	0
134	4	4	1	1	3	10	1	4	1	0	2
135	6	4	0	0	1	20	1	5	2	0	0
136	6	4	0	0	1	3	0	4	1	0	0
137	8	5	0	0	2	3	0	5	2	0	0
138	9	6	0	0	0	10	1	6	2	0	0
139	10	5,5	0	0	1	10	1	6	2	0	0
140	6,5	5	1	0	0	60	3	5	2	10	0
141	4	4	0	0	1	10	1	5	2	0	0
142	10	4	4	0	1	30	2	5	2	15	0
143	4	3,5	1	0	2	30	2	5	2	7	0
144	4	4,5	0	0	2	15	1	5	2	10	1
145	12	4	0	0	1	10	1	5	2	0	0
146	8	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
147	4	3,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
148	6	6,5	0	0	0	3	0	6	2	20	0
149	4	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
150	4	4	4	2	3	40	2	5	2	30	12

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
151	12	6	0	0	0	10	1	5	2	10	0
152	10	4,5	0	0	0	3	0	5	2	0	0
153	6	6	0	0	0	10	1	5	2	0	0
154	8	4,5	1	0	0	10	1	5	2	0	0
155	9	4	0	0	1	3	0	5	2	0	2
156	8	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
157	3	4	0	0	1	10	1	5	2	0	0
158	8	5	2	0	0	30	2	4	1	20	0
159	3,5	4	0	0	1	10	1	6	2	0	0
160	12	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
161	0	4,5	0	0	0	10	1	5	2	0	0
162	8,5	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
163	7	3,5	0	0	1	3	0	5	2	0	0
164	8	5	0	0	2	3	0	5	2	0	0
165	10	3,5	1	0	0	20	1	4	1	0	0
166	6	5,5	1	0	0	10	1	6	2	20	0
167	8,5	3	0	0	0	3	0	5	2	0	0
168	10	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
169	8,5	4	1	0	2	20	1	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
170	7	4	1	0	3	7	0	5	2	7	0
171	8	3	0	0	1	10	1	4	1	0	4
172	5,5	4	0	0	0	20	1	4	1	0	0
173	8,5	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
174	6,5	3,5	0	0	0	10	1	4	1	0	0
175	8	4	0	0	0	10	1	5	2	0	0
176	8,5	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
177	12	5,5	0	0	2	3	0	5	2	20	0
178	6	4,5	0	0	1	10	1	5	2	0	0
179	4	2	0	0	1	3	0	4	1	0	0
180	1	5	0	0	2	3	0	5	2	7	0
181	10	4,5	1	0	2	10	1	5	2	25	0
182	6	4	1	0	0	10	1	5	2	0	0
183	10	4,5	1	0	0	10	1	5	2	0	0
184	8	4,5	1	0	1	10	1	5	2	0	0
185	5	2,5	1	1	3	30	2	4	1	0	3
186	6	4	0	2	2	3	0	6	2	0	0
187	6,5	4,5	0	0	0	10	1	5	2	0	0
188	10	4,5	0	0	1	3	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
189	12	5,5	0	0	1	3	0	5	2	0	0
190	10	1,5	0	1	1	10	1	5	2	0	0
191	4	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0
192	12	4	0	0	1	3	0	5	2	0	0
193	6	5	1	0	1	30	2	5	2	0	0
194	12	5	0	0	1	3	0	5	2	0	0
195	8	4	0	0	2	10	1	5	2	0	0
196	8	4	0	0	0	3	0	4	1	0	0
197	12	6	2	0	0	30	2	5	2	0	0
198	8	6	0	0	0	3	0	5	2	0	0
199	9	6	0	0	1	3	0	5	2	0	0
200	7	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
201	7	4,5	1	1	0	3	0	4	1	0	0
202	12	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
203	8	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
204	12	3	0	0	3	3	0	5	2	0	0
205	6	4	1	0	1	10	1	5	2	15	0
206	8	5	2	0	0	20	1	5	2	7	2
207	8	4,5	1	0	0	3	0	5	2	10	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
208	12	4	0	0	3	10	1	5	2	0	0
209	12	5	0	0	1	3	0	5	2	10	0
210	8	4	2	0	1	10	1	5	2	0	12
211	0	4	0	0	2	20	1	5	2	0	0
212	12	4	0	0	1	3	0	5	2	0	0
213	12	4	0	0	0	3	0	5	2	15	0
214	6	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
215	10	4	1	0	0	30	2	5	2	0	0
216	10	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
217	10,5	4	0	0	1	3	0	5	2	20	0
218	12	4	1	0	0	3	0	4	1	0	0
219	4	4	0	0	0	3	0	4	1	0	0
220	8	4	0	0	1	3	0	5	2	10	0
221	12	4	1	0	2	3	0	5	2	0	0
222	8	4	0	0	0	3	0	5	2	0	0
223	6	3,5	1	0	3	3	0	4	1	0	12
224	12	4	1	0	3	10	1	5	2	15	0
225	8	4	2	0	2	10	1	4	1	7	12
226	12	4	0	0	3	3	0	5	2	0	0

Tabla 2.1

Nº Caso	E-Cadherina	Twist	Surv.	CD 117	CD 44	CDK2	CDK2	RKIP	RKIP	TOPO-2alfa	Fascina
227	12	4,5	0	0	3	10	1	5	2	0	0
228	12	6	0	0	0	3	0	5	2	15	0
229	10	4	0	0	2	3	0	5	2	0	0
230	10	4	0	0	1	3	0	5	2	0	0
231	12	3,5	2	0	2	10	1	5	2	6	1
232	9	6	3	2	2	10	1	5	2	0	8
233	10,5	5	0	1	2	3	0	5	2	0	0
234	8	3,5	0	1	0	10	1	5	2	0	8

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
1	4	0	24	0	0	8	0	10	0	2	0	1	1
2	8	0	27	0	1	8	8	15	0	2	0	1	2
3	4	0	10	3	2	8	8	20	0	2	0	2	2
4	4	0	0	0	1	0	0	35	0	2	0	1	4
5	8	10	0	0	1	0	0	85	0	2	0	1	4
6	8	0	24	70	1	8	8	75	3	2	0	0	3
7	8	0	24	0	2	8	8	10	1	2	1	1	1
8	4	0	24	0	1	8	8	50	0	2	1	0	2
9	8	0	27	0	1	8	8	10	0	2	1	1	1
10	8	0	0	75	1	0	0	60	0	2	0	0	4
11	12	0	21	0	1	8	8	50	0	2	1	1	4
12	8	0	24	5	1	8	0	20	3	2	0	2	3

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
13	4	0	24	0	2	8	0	30	2	2	1	0	3
14	4	0	14	15	2	0	5	15	1	2	0	2	4
15	8	0	27	0	0	8	8	15	1	2	0	1	2
16	8	0	12	0	0	8	7	60	3	2	0	0	3
17	8	0	21	0	1	8	8	20	0	2	0	1	2
18	4	160	0	95	2	0	0	50	0	1	0	1	4
19	4	0	16	0	1	8	8	10	3	2	0	1	3
20	8	0	27	0	0	8	5	40	0	2	1	1	2
21	12	270	0	0	1	0	0	70	0	1	1	0	4
22	8	0	16	70	0	8	0	15	1	2	0	1	2
23	8	0	27	0	0	8	8	15	0	1	0	0	2
24	4	0	14	0	1	8	8	40	3	1	0	1	3

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
25	12	0	24	0	1	8	8	15	0	2	0	0	2
26	8	0	24	0	1	8	8	10	0	2	1	1	1
27	8	0	16	0	1	8	8	35	0	2	1	1	2
28	8	0	7	0	1	8	0	40	0	1	1	2	2
29	8	0	16	0	0	8	8	15	0	1	0	1	2
30	4	0	21	0	0	8	8	10	0	2	1	0	1
31	8	0	3	10	1	8	5	30	1	1	1	1	2
32	4	0	12	0	2	8	8	20	0	1	0	1	2
33	8	0	16	5	0	8	5	35	0	2	1	1	2
34	8	0	24	5	1	8	8	15	3	1	1	1	3
35	8	0	16	0	2	8	8	20	0	2	0	1	2
36	8	0	16	0	1	8	7	10	0	2	0	1	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
37	12	0	14	0	2	0	0	75	3	2	0	0	3
38	4	0	7	0	1	7	0	50	3	2	0	1	3
39	4	0	16	0	1	8	0	5	1	2	1	1	1
40	4	0	14	0	0	8	7	45	0	2	0	0	2
41	4	0	14	0	1	6	6	20	2	2	0	0	3
42	8	0	18	0	2	7	7	10	1	2	0	0	1
43	8	0	16	1	2	7	8	10	1	2	0	0	1
44	8	0	18	10	0	7	7	15	2	2	0	0	3
45	4	0	18	0	1	8	7	30	1	1	0	1	2
46	8	0	24	0	1	6	5	30	3	1	0	0	3
47	8	0	16	0	1	8	8	30	0	2	0	0	2
48	8	0	18	0	1	8	8	20	0	2	0	0	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
49	8	0	15	0	1	8	8	10	0	1	1	0	1
50	8	0	8	0	1	8	8	25	0	2	0	0	2
51	4	0	0	0	2	0	0	90	0	1	0	0	4
52	8	0	27	0	0	8	5	20	1	2	0	0	2
53	4	40	16	50	1	0	0	40	3	2	0	0	3
54	4	0	24	60	1	8	6	30	3	1	1	0	3
55	12	0	14	0	1	8	8	15	0	1	0	0	2
56	4	0	21	0	1	8	6	50	1	2	0	0	2
57	8	0	14	0	2	7	5	20	2	2	0	0	3
58	8	0	27	0	1	8	0	5	0	1	1	1	1
59	4	0	24	0	2	8	6	60	0	1	0	0	2
60	3	0	16	0	2	8	6	10	3	2	0	0	3

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
61	4	0	16	15	2	0	0	40	3	2	0	1	3
62	6	0	27	0	1	8	8	75	2	2	0	0	3
63	8	0	18	0	1	7	5	75	3	2	0	0	3
64	4	0	24	0	1	7	5	10	0	2	0	0	1
65	8	0	27	0	0	8	8	10	0	2	0	1	1
66	4	0	18	2	0	8	8	10	0	2	0	0	1
67	4	0	14	2	2	7	0	75	0	1	0	0	2
68	4	0	8	0	1	8	8	70	0	1	0	1	2
69	4	0	24	2	0	8	8	5	0	2	0	0	1
70	4	0	27	0	0	8	7	10	3	1	0	0	3
71	4	0	27	0	1	8	8	25	3	1	0	0	3
72	4	0	18	4	1	8	8	25	0	2	0	0	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
73	8	0	24	0	1	8	8	35	0	2	0	0	2
74	8	0	21	20	1	8	6	75	3	2	0	0	3
75	4	0	16	0	0	7	7	50	3	2	0	0	3
76	8	0	24	0	2	0	5	10	0	2	0	1	4
77	8	0	14	0	0	8	5	8	1	2	0	0	1
78	4	0	24	0	1	7	8	50	0	1	1	1	2
79	4	0	21	5	0	6	3	40	2	1	1	0	3
80	8	0	24	80	1	8	0	20	1	1	1	0	1
81	12	0	27	2	1	8	8	5	0	2	1	0	1
82	8	0	27	0	1	8	8	10	0	2	1	0	1
83	8	0	16	0	1	7	0	35	0	2	1	0	2
84	8	0	24	0	1	8	8	5	0	2	0	0	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
85	8	0	18	2	1	7	0	30	0	2	0	0	2
86	4	0	24	50	1	7	5	25	1	2	0	0	2
87	8	0	18	70	2	6	3	40	1	2	0	0	2
88	6	0	16	0	1	5	5	10	1	2	0	1	1
89	12	0	24	0	1	4	5	20	0	2	1	1	1
90	4	90	21	0	1	7	8	10	2	2	0	0	3
91	8	0	27	0	1	8	4	5	2	1	1	0	3
92	8	0	21	0	1	7	6	5	2	2	1	0	3
93	8	0	24	3	1	0	0	50	0	2	0	0	4
94	4	0	24	0	1	8	7	5	0	1	1	0	1
95	8	0	16	0	1	0	8	25	0	2	0	1	4
96	4	0	24	0	1	8	8	10	0	1	1	0	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
97	4	0	16	0	0	4	4	30	2	1	0	1	3
98	12	120	21	20	1	6	4	15	1	1	0	0	2
99	4	0	21	0	1	6	0	10	3	2	0	0	3
100	8	210	0	20	2	0	0	40	0	2	1	0	4
101	8	0	27	7	0	8	7	5	1	2	0	1	1
102	8	0	16	0	2	8	8	15	0	2	0	1	2
103	4	0	21	0	1	7	8	25	1	2	0	0	2
104	8	0	16	80	1	7	8	75	0	2	0	0	2
105	4	30	21	20	2	0	0	10	0	2	0	1	4
106	8	0	21	15	1	7	4	30	0	2	1	1	2
107	8	0	18	0	1	8	3	10	0	2	0	0	1
108	8	0	24	8	1	8	3	30	2	2	0	1	3

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
109	4	0	18	0	0	4	0	75	3	1	0	1	3
110	12	0	24	0	2	6	8	20	3	2	1	1	3
111	8	0	24	0	2	8	8	15	1	2	0	0	2
112	4	0	18	0	1	8	8	5	1	2	0	1	1
113	8	0	0	90	0	0	0	50	0	2	0	1	4
114	8	0	5	70	0	0	0	35	0	1	0	1	4
115	8	0	18	60	2	8	0	20	3	2	0	0	3
116	8	0	16	3	1	7	8	15	1	2	0	1	2
117	8	0	16	0	1	8	7	10	1	2	0	0	1
118	4	0	7	0	0	0	5	25	1	2	0	0	4
119	8	0	12	80	0	0	0	35	2	1	1	0	3
120	4	0	16	0	1	0	0	25	0	2	0	0	4

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
121	4	0	12	0	0	9	3	15	1	2	0	1	2
122	4	0	24	0	0	6	0	5	0	2	0	0	1
123	4	0	12	0	1	7	7	10	0	2	0	1	1
124	4	0	16	0	0	4	8	10	2	2	0	0	3
125	4	0	14	0	1	4	5	5	0	2	1	0	1
126	4	0	16	0	1	8	0	10	3	2	0	0	3
127	4	0	14	80	1	8	8	60	1	2	0	0	2
128	4	0	21	0	1	4	7	45	3	2	1	0	3
129	4	15	8	0	1	4	6	10	1	2	0	0	1
130	4	0	16	0	1	5	0	30	2	2	0	0	3
131	8	0	16	0	1	7	7	25	1	2	0	0	2
132	4	0	16	2	1	3	5	40	0	1	0	1	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
133	8	0	16	0	1	7	5	40	1	1	0	1	2
134	8	0	0	60	1	0	0	70	0	2	0	0	4
135	4	0	18	30	2	3	6	50	2	2	0	0	3
136	4	0	16	0	1	7	8	15	2	1	0	0	3
137	4	0	16	0	1	7	4	20	1	2	0	1	2
138	8	0	21	0	0	7	8	5	0	2	0	1	1
139	4	90	27	0	1	6	6	5	0	2	0	1	1
140	8	0	24	20	1	7	8	15	1	2	0	1	2
141	4	0	18	20	1	6	6	60	0	2	0	0	2
142	4	0	18	0	2	8	8	30	2	1	0	0	2
143	8	0	16	0	1	8	3	10	0	1	0	0	1
144	4	90	18	0	1	7	0	20	0	1	0	1	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
145	8	0	16	0	1	8	4	1	1	2	0	0	1
146	8	0	16	0	1	4	8	2	1	2	0	1	1
147	4	0	16	0	0	8	8	5	0	2	0	0	1
148	8	0	27	0	0	8	8	10	0	1	1	1	1
149	4	0	8	15	2	7	3	5	1	2	0	2	1
150	8	0	0	90	2	0	0	75	1	2	0	0	4
151	8	0	27	0	1	8	3	15	1	1	0	0	2
152	8	0	18	0	1	0	7	5	0	2	0	1	4
153	8	0	7	8	2	4	7	60	0	1	0	0	2
154	8	0	24	1	1	8	8	25	1	1	0	0	2
155	4	0	14	0	1	5	8	20	1	2	0	0	2
156	4	0	8	0	1	7	8	8	1	2	0	1	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
157	4	0	16	0	0	7	7	10	0	2	0	1	1
158	8	0	27	0	1	8	4	35	0	2	0	1	2
159	4	0	14	0	0	8	5	5	1	1	1	1	1
160	8	0	27	0	1	0	3	10	0	2	1	1	4
161	8	0	21	0	1	5	3	20	0	1	1	0	2
162	8	0	18	0	0	5	5	10	0	2	0	0	1
163	4	0	24	0	1	8	7	5	1	2	1	1	1
164	4	0	14	0	1	7	8	5	0	1	1	1	1
165	4	0	24	1	1	6	4	30	0	2	0	1	2
166	8	0	27	5	2	8	8	5	1	2	1	1	1
167	4	0	14	0	1	8	4	10	1	1	1	1	1
168	4	0	14	0	1	6	8	10	1	2	0	1	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
169	8	14	14	40	1	0	0	30	3	2	0	1	3
170	8	0	18	5	0	5	8	5	1	2	0	1	1
171	4	0	0	0	1	0	0	75	1	1	0	1	4
172	4	0	16	0	2	8	5	20	1	2	0	2	2
173	8	0	14	5	1	8	5	20	0	2	0	1	2
174	8	0	9	1	1	7	3	25	3	1	0	1	3
175	4	0	18	0	0	7	8	80	1	2	0	1	2
176	12	0	24	0	1	8	8	5	1	2	0	1	1
177	8	0	27	0	1	7	8	2	0	2	1	1	1
178	8	0	16	30	1	5	7	20	1	2	0	1	2
179	8	0	8	70	1	0	0	35	3	2	0	1	3
180	8	0	27	0	0	8	8	15	1	2	1	1	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
181	8	0	24	0	0	8	7	10	1	2	1	1	1
182	8	0	16	0	1	0	0	40	3	2	0	1	3
183	8	0	16	0	0	6	7	15	1	2	0	2	2
184	8	0	24	0	2	0	6	30	3	2	1	1	3
185	4	0	7	0	1	0	0	25	0	2	0	1	4
186	8	0	14	0	0	0	7	15	1	2	1	1	4
187	4	0	14	0	1	0	0	15	0	2	0	1	4
188	8	0	27	0	0	6	5	5	0	2	0	1	1
189	4	0	21	0	0	6	5	20	0	2	0	1	2
190	4	0	16	60	1	0	0	30	3	1	0	1	3
191	8	0	16	0	1	0	8	5	0	1	0	1	4
192	8	0	27	0	0	8	7	8	1	1	0	0	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
193	4	0	27	0	2	8	0	40	1	1	1	1	2
194	4	0	21	0	1	3	8	5	0	1	0	2	1
195	8	0	27	5	0	6	8	5	0	2	0	1	1
196	4	0	16	0	1	8	8	10	0	1	0	0	1
197	8	0	27	80	0	6	8	33	0	1	0	0	2
198	8	0	27	0	1	6	7	10	1	2	1	1	1
199	8	0	24	0	1	7	0	8	0	2	0	1	1
200	4	0	21	0	0	7	8	10	1	2	1	1	1
201	4	0	16	15	1	0	3	10	3	1	0	0	3
202	4	0	24	1	1	2	8	15	0	2	0	1	2
203	4	0	16	0	1	6	8	10	0	1	0	0	1
204	8	0	16	0	1	8	0	5	1	2	0	0	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
205	8	0	16	0	1	7	4	35	1	2	0	1	2
206	4	0	14	60	1	5	3	25	0	2	0	0	2
207	4	0	16	0	2	8	8	20	0	1	0	1	2
208	4	0	24	3	1	7	6	10	0	2	1	1	1
209	4	0	18	0	0	6	5	20	1	2	0	0	2
210	4	30	0	0	1	0	0	60	0	2	0	1	4
211	4	0	16	0	1	7	7	35	0	1	0	0	2
212	4	0	24	0	2	7	3	10	0	1	0	1	1
213	8	0	21	0	0	0	3	20	2	2	0	1	3
214	4	0	14	0	1	0	0	5	0	2	0	1	4
215	4	0	16	0	2	0	0	25	0	2	0	1	4
216	4	0	8	11	2	8	3	15	0	2	0	2	2

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
217	4	0	21	0	1	8	6	15	0	2	0	1	2
218	4	0	5	30	2	0	0	25	3	1	1	0	3
219	4	0	18	0	1	0	0	45	2	2	0	1	3
220	4	0	27	0	1	8	8	15	1	2	1	1	1
221	4	0	24	15	1	8	0	15	1	2	0	0	2
222	4	0	24	0	2	6	8	10	0	2	0	1	1
223	8	180	0	0	1	0	0	60	0	2	0	1	4
224	4	0	21	40	1	8	7	30	0	2	1	0	2
225	4	180	1	0	2	0	0	75	0	2	0	0	4
226	4	0	16	0	1	7	6	5	0	2	0	1	1
227	4	0	21	0	2	8	7	15	0	2	0	0	2
228	4	0	24	0	0	8	8	10	0	1	1	0	1

Resultados: tabla 2.1

Nº Caso	ABCG2	CK 5/6	FOXA 1	p53	CD 10	RE	RP	Ki 67	HER2	CXCR4_ citoplas	CXCR4_ nucleo	Caveolina	Perfil Molecular
229	4	0	16	0	1	7	5	5	0	2	0	1	1
230	4	0	21	0	1	8	8	11	1	2	0	1	1
231	8	0	16	70	1	0	0	35	3	2	0	1	3
232	8	240	0	50	2	0	7	60	0	2	0	2	4
233	8	0	24	0	0	8	8	10	1	2	0	1	1
234	4	60	0	80	2	0	6	60	0	1	0	1	4

Resultado Inmunohistoquímico en relación con la Recidiva. *Tabla 2.2*

	Positivo	Negativo
E- Cadherina	32 (76,19%)	10 (23,8%)
Twist	3 (7,14%)	39 (92,86%)
Survivina	19 (45,23%)	23 (54,76%)
CD117	5 (11,9%)	37 (88,09%)
CD44	23 (54,76%)	19 (45,24%)
TOPO2-alfa	4 (9,52%)	38 (90,47%)
Fascina	6 (14,28%)	36 (85,71%)
ABCG2	42 (100%)	0 (0%)
CK5/6	6 (14,28%)	36 (85,71%)
FOXA	37 (88,09%)	5 (11,9%)
p53	12 (28,57%)	30 (71,43%)
CD10	30 (71,43%)	12 (28,57%)
Estrógenos	28 (66,6%)	14 (33,3%)
Progesterona	26 (61,9%)	16 (38,09%)
Ki67	33 (78,57%)	9 (21,43%)

Her2	9 (21,43%)	33 (78,57%)
CXCR4-citoplasma	31 (73,8%)	11 (26,19%)
CXCR4-núcleo	11 (26,19%)	31 (73,8%)
Caveolina	21 (50%)	21 (50%)

	Recidiva
CDX2_0	13 (30,95%)
CDX2_1	22 (52,38%)
CDX2_2	5 (11,9%)
CDX2_3	1 (2,38%)
CDX2_4	1 (2,38%)
RKIP_1	7 (16,6%)
RKIP_2	35 (83,3%)
Luminal A	9 (21,43%)
Luminal B	15 (35,71%)
Her2	8 (19,04%)
Basal-like	10 (23,8%)

Resultado Inmunohistoquímico en relación con la Mortalidad. *Tabla 2.3*

	Positivo	Negativo
E- Cadherina	21 (77,7%)	6 (22,3%)
Twist	2 (7,41%)	25 (92,6%)
Survivina	12 (44,4%)	15 (55,6%)
CD117	1 (3,7%)	26 (96,3%)
CD44	12 (44,4%)	15 (55,6%)
TOPO2-alfa	4 (14,81%)	23 (85,18%)
Fascina	3 (11,1%)	24 (88,9%)
ABCG2	27 (100%)	0 (0%)
CK5/6	4 (14,82%)	23 (85,18%)
FOXA	24 (88,9%)	3 (11,1%)
p53	7 (25,93%)	20 (74,07%)
CD10	21 (77,7%)	6 (22,3%)
Estrógenos	16 (59,26 %)	11 (40,74%)
Progesterona	19 (70,37%)	8 (29,63%)

Ki67	18 (66,6%)	9 (33,4%)
Her2	5 (18,52%)	22 (81,48%)
CXCR4-citoplasma	21 (77,7%)	6 (22,3%)
CXCR4-núcleo	6 (22,3%)	21 (77,7%)
Caveolina	15 (55,5%)	12 (44,5%)

	Mortalidad
CDX2_0	10 (37,03%)
CDX2_1	12 (44,4%)
CDX2_2	3 (11,1%)
CDX2_3	0 (0%)
CDX2_4	2 (7,41%)
RKIP_1	6 (22,2%)
RKIP_2	21 (77,8%)
Luminal A	5 (18,52%)
Luminal B	8 (29,63%)
Her2	5 (18,52%)
Basal-like	9 (33,4%)

4.3 Estudios Estadísticos Univariantes:

A. Asociación de marcadores inmunohistoquímicos y evolución de la enfermedad:

- Asociación con recidiva.

Hemos observado una relación estadísticamente significativa entre recidiva y la expresión de los siguientes marcadores inmunohistoquímicos: CK 5/6 ($p < 0,016$), con un Exp (B) = 2,889; fascina ($p < 0,036$), con un Exp (B) = 2,524; FOXA1 ($p=0,005$), Exp (B) = 0,404; Ki67 ($p < 0,047$), con un Exp (B) = 2,113, RP ($p < 0,039$), con un Exp (B) = 0,514, y TOP2A ($p < 0,047$), con un Exp (B) = 0,352.

Estos datos indican un aumento del riesgo de recidiva de casi dos veces en las pacientes que tienen expresión elevada de Ki67, y de tres veces para las que expresan CK5/6 o fascina. En cambio, se advierte una reducción importante para las que expresan RP, TOP2A y FOXA1, del orden de dos, tres y cuatro veces, respectivamente.

- Asociación con mortalidad.

Hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre mortalidad y la expresión de CDK-2 ($p < 0,006$), Exp (B) = 8,726. Estos datos ponen de manifiesto que la expresión de CDK2 supone un riesgo de casi 9 veces para que el paciente fallezca como consecuencia de la enfermedad.

- Asociación combinada con recidiva y mortalidad.

En nuestro estudio, hemos advertido relación estadísticamente significativa entre recidiva y mortalidad y la expresión de los siguientes marcadores: RE ($p < 0,005$, $p < 0,003$; Exp(B) = 0,395, Exp(B) = 0,314), p53 ($p < 0,012$, $p < 0,003$; Exp(B) = 2,315, Exp(B) = 2,081) y fenotipo molecular tipo basal ($p=0,009$) y ($p=0,009$). Exp(B)=3,459, y Exp(B)=4,262, respectivamente.

Estos datos ponen de manifiesto una reducción del riesgo de recidiva y mortalidad del orden de cuatro veces en las pacientes que presentan expresión de RE y un aumento del riesgo del orden de dos veces para las que expresan p53 y de cuatro veces para las portadoras de un fenotipo molecular tipo basal.

- *No asociación con evolución.*

No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el resto de los marcadores evaluados y las variables recidiva y mortalidad. Los resultados obtenidos son los siguientes: E-cadherina (p=0,461)(p=0,88) recidiva y mortalidad respectivamente, twist (p=0,376)(p=0,552), CD117 (p=0,805)(p=0,271), CD44 (p=0,764)(p=0,412), RKIP (p=0,820)(p=0,639), HER2 (p=0,723)(p=0,744), CXCR4 (p=0,822)(p=0,553) y CD10 (p=0,468)(p=0,561).

B. Asociación de otros factores y evolución de la enfermedad:

- *Asociación con recidiva*

Hemos observado relación estadísticamente significativa entre recidiva tumoral y las siguientes variables: número de ganglios positivos para metástasis de carcinoma ($p < 0,013$) ($\text{Exp (B)} = 2,171$); y tamaño tumoral ($p < 0,037$) ($\text{Exp (B)} = 1,319$).

Estos hallazgos significan un incremento del riesgo de recidiva de alrededor de dos veces para las portadoras de metástasis ganglionares y para las que tienen un tamaño tumoral mayor de 2,678 cm.

- *Asociación con recidiva y mortalidad*

El estudio estadístico reveló una relación estadísticamente significativa de recidiva y mortalidad con las siguientes variables: estadio inicial del tumor (según escala TNM entre IA a IV) y grado histológico tumoral (valorado en base a la escala de NOTTINGHAM).

En relación con el estadio, las pacientes con estadio inicial IIIA ($p < 0,000$, $p < 0,003$; $\text{Exp (B)} = 8,080$, $\text{Exp (B)} = 7,419$) presentan un incremento del riesgo de recidiva y mortalidad del orden de ocho veces, cuando se comparan con las portadoras de tumores en estadio IA.

Con respecto al grado tumoral, las portadoras de un grado histológico 3 tienen un riesgo de recidiva y mortalidad casi 5 veces superior ($p = 0,009$, $p = 0,038$; $\text{Exp(B)} = 4,14$, $\text{Exp(B)} = 4,784$) al encontrado en las mujeres con tumores grado 1.

- *No asociación con evaluación de la enfermedad.*

Nuestros resultados no han encontrado relación estadísticamente significativa entre evolución de la enfermedad y la edad del paciente en el momento del diagnóstico de la enfermedad ($p = 0,718$) y ($p = 0,688$) respectivamente.

4.4. Estudio estadístico multivariante:

- *Asociación con recidiva:*

Hemos observado relación estadísticamente significativa entre recidiva tumoral y la co-expresión de TOP2A/RE ($p < 0,021$; $p < 0,006$; $\text{Exp}(B) = 0,294$; $\text{Exp}(B) = 0,388$) respectivamente. Estos datos ponen de manifiesto que la expresión TOP2A+/RE+ se asocia con una disminución del riesgo de recidiva, del orden de tres veces.

- *Asociación con mortalidad:*

En relación con la mortalidad, hemos encontrado asociación significativa de la co-expresión C-KIT/RE con la mortalidad ($p < 0,05$; $p < 0,00$; $\text{Exp}(B) = 0,127$; $\text{Exp}(B) = 0,208$) respectivamente, de tal modo que la co-expresión C-KIT+/RE+ supone una disminución del riesgo de casi dos veces para que el paciente fallezca como consecuencia de la enfermedad.

"La locura de una persona es la realidad de otra"

Tim Burton

5. Discusión

5.1. Estudio Univariante con relación significativa

A. ASOCIACIÓN CON RECIDIVA

La **CK 5/6** es una citoqueratina de alto peso molecular que forma parte del citoesqueleto de las células eucariotas. En la mama normal se expresa exclusivamente en las células basales (300).

Nuestros resultados señalan que su sobreexpresión en el carcinoma de mama invasor guarda asociación con la recidiva tumoral, siendo el incremento del riesgo de casi 3 veces. Estos hallazgos están de acuerdo con lo señalado previamente por Bhargava et al (227); según estos autores, la CK 5/6 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la estructura celular y en la protección frente a factores de estrés celular, de tal modo que su alteración conduce a la inestabilidad genética y a la pérdida de control sobre el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular (227).

Otros autores han encontrado asociación entre expresión de CK 5/6 y otros factores, como subtipo molecular *basal-like* (223); posteriormente, Wasserman et al. (224) han referido una sensibilidad superior al 90% en los carcinomas de mama con este fenotipo especial. Ramírez (226) ha relacionado la expresión de CK 5/6 con un elevado índice mitótico y presencia de necrosis tumoral.

La **FASCINA** es una proteína de unión de 493 aminoácidos, cuya fosforilización y unión a la actina desarrolla el complejo Arp2/3, muy importante para la formación de filopodios y lamellipodias, estructuras necesarias para el desplazamiento celular.

Nuestros resultados señalan que la expresión de fascina se asocia significativamente con la recidiva, indicando un incremento de riesgo de casi tres veces. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por Jawhari et al (263), Hashimoto et al (272) y Xing (264) y ponen de relieve el importante papel de la fascina en la movilidad celular y favorecimiento de la invasión tumoral. En este sentido, Al-Alwan et al (273) han observado expresión reducida o ausente en lesiones in situ, precancerosas o benignas y sobreexpresión en carcinomas invasivos. Resultados similares han sido descritos también por Yoder et al (270), que además, ha relacionado su sobreexpresión con el tamaño tumoral y la presencia de metástasis ganglionar y señalan que la expresión de fascina es un factor de mal pronóstico.

El **FOXA1** es un factor de transcripción que se detecta en la etapa tardía de la embriogénesis. Su función consiste en configurar la cromatina para permitir el desarrollo de otros factores de transcripción. En la mama interviene en el desarrollo de los conductos y la diferenciación terminal de los alveolos; la ausencia de expresión de FOXA1 se relaciona con el bloqueo de la diferenciación celular y con la presencia de estructuras ductales inmaduras.

Nuestros resultados señalan que la expresión de FOXA1 se asocia significativamente con un menor riesgo de recidiva del orden de casi cuatro veces. Estos resultados están de acuerdo con lo previamente señalado por Bernardo et al (288) y Wolf et al (279) que destacaban la importancia de la función de FOXA1 en la morfogénesis mamaria. Resultados semejantes también han sido descritos por Nakshatri et al (294), que establecen una relación entre la expresión de FOXA1 y presencia de metástasis ganglionares. Hannenhalli et al (275), han encontrado relación entre la ausencia de expresión de FOXA1 y carcinomas de mama RE- y Thorat et al (290) han señalado que la ausencia de expresión de FOXA1 se relaciona con la expresión positiva para citoqueratinas basales.

Además de su influencia sobre el nivel de los receptores hormonales, Wolf et al (279), Mehta et al (289) y Hosl et al (330) han encontrado asociación entre expresión de FOXA1 y co-expresión Wnt1/ILK y e-cadherina +, poniendo de manifiesto la relación de FOXA1 con el fenotipo molecular luminal A, con una incidencia > 86%. Resultados totalmente superponibles han sido señalados mediante la activación de los inhibidores de los complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclina (C-CDK) (286).

El **Ki67** es una proteína nuclear que actúa de manera constante durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular, presenta un pico de actividad en la fase de mitosis (M) y está ausente en la fase G0.

Nuestros resultados señalan que la expresión de Ki67 se asocia significativamente con la recidiva, con un nivel de riesgo de casi dos veces. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por Lopez et al (317) y Urruticoechea et al (318), y muestran la importante función del Ki67 en el ciclo celular.

Otros autores han encontrado asociación entre el índice de Ki67 con diversos factores: incremento del índice mitótico, metástasis ganglionares y menor supervivencia global (319), subfenotipo molecular luminal A y B, correspondiendo éste último a un Ki67 superior al 13,25% (302, 401) y mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia (320, 321) y han registrado una disminución del índice de proliferación tras finalizar neoadyuvancia.

Los **RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP)** o NR3C3 son un tipo de receptor esteroideo que se une específicamente a la progesterona. Han sido descritas dos formas (RP-A y RP-B), ambas codificadas por el mismo gen pero reguladas por distintos promotores, siendo la función de los RP-B un fuerte activador transcripcional. Los RE inducen la activación de los promotores del gen de los RP y, por tanto, regulan su expresión.

Nuestros resultados señalan que la expresión de RP se asocia significativamente con un menor riesgo de recidiva. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por Guerra Araiza et al (333) y ponen de relieve la importancia de los RP, al igual que de los RE, en el control del ciclo celular en el cáncer de mama.

Otros autores han encontrado asociación entre la expresión de RP y otras variables; en este sentido Noorasmaliza ha señalado asociación con el grado tumoral e índice de proliferación celular (Ki67) (402), de tal modo que los tumores de alto grado y elevado Ki67 muestran expresión reducida o ausente, mientras que los tumores de bajo grado y menor índice proliferativo se relacionan con una sobreexpresión de RP. De igual manera, Viale et al. (303) han señalado asociación de la expresión de RP con la expresión de RE y la respuesta a tratamiento endocrino, de manera que los tumores RP+/RE+ muestran mejor respuesta al tratamiento con Tamoxifeno que aquellos tumores con ausencia de expresión estrogénica.

La **TOP2A** es una enzima nuclear codificada por el gen *TOP2A* cuya amplificación se produce en presencia de la amplificación de HER2. En condiciones normales, su acción es controlar los estados topológicos del ADN durante la transcripción genética e

interviene en la fase G2 y M del ciclo celular resolviendo los problemas de transcripción, recombinación, replicación y segregación cromosómica.

Nuestros resultados señalan que la expresión de TOP2A se asocia significativamente con una menor tasa de recidiva, del orden de tres veces. Estos datos están de acuerdo con lo previamente señalado por Brase et al (368) y Press et al (369), y ponen de relieve el importante papel de la TOP2A en el proceso de proliferación de células neoplásicas en el cáncer de mama.

La expresión de TOP2A también se ha relacionado con otros factores. O'Malley et al (370) y Desmedt et al (371) han encontrado asociación con HER2, el grado tumoral y el nivel de respuesta al tratamiento adyuvante con Herceptin, de manera que los tumores de alto grado con sobreexpresión de TOP2A y HER2 muestran una mejor respuesta al tratamiento anti-HER2. Fountzilas G. et al (296) han señalado que la influencia de la expresión de TOP2A sobre el pronóstico de la enfermedad podría estar en relación con la proximidad del gen TOPA2 al HER2, de tal modo que la amplificación de HER2 podría arrastrar por contigüidad al gen TOP2A, ya que dicha co-amplificación se asocia a una mejor respuesta al tratamiento con antraciclinas y otros agentes quimioterápicos.

B. ASOCIACIÓN CON MORTALIDAD

La **CDK2** es una quinasa dependiente de ciclina que interviene en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, al formar complejos con la ciclina E. Posteriormente, y durante la fase S, forma también complejos con la ciclina A. Su acción es inhibida por las proteínas inhibidoras del complejo C-CDK p21, p27 y p57. Los complejos ciclina E-CDK4, conjuntamente con los formados por las ciclinas D-CDK4 y ciclina D-CDK6, intervienen en la fosforilación de la proteína Rb y por tanto en la liberación del factor de transcripción E2F, retenido por la proteína Rb hipofosforilada.

Nuestros resultados señalan que la expresión de CDK2 se asocia significativamente con la mortalidad, con un incremento del riesgo de casi nueve veces. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por Robert et al (210) y Georgieva et al (193), y ponen de relieve el importante papel de la vía del retinoblastoma en el carcinoma de mama. Resultados semejantes a los descritos con la sobreexpresión de CDK2 se obtienen también mediante la inactivación de los inhibidores de los complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclina (C-CDK). Cordon-Cardo (198) han señalado que la relación entre expresión de CDK2 con el pronóstico de la enfermedad descansa en la proporción de isoformas de alto y bajo peso molecular, ya que éstas últimas son las que desempeñan un papel relevante en el ciclo celular.

Kuz`bicki et al. (209) han encontrado asociación entre la expresión de CDK2 y el grado tumoral, de tal modo que los tumores de alto grado muestran sobreexpresión y las lesiones de bajo grado, precancerosas o benignas, una expresión reducida o ausente.

C. ASOCIACIÓN CON RECIDIVA Y MORTALIDAD

Los **RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE)** son receptores nucleares activados por la hormona 17 β -estradiol. Actúan como factor de transcripción que se une al ADN y regula la expresión genética de diversos genes implicados en el crecimiento celular.

Nuestros hallazgos señalan que la expresión de RE se asocia significativamente con un menor riesgo de recidiva y mortalidad, del orden de casi cuatro veces, lo cual describe a los RE como un marcador de buen pronóstico. Estos resultados están de acuerdo con lo señalado previamente por Segal et al (403) y Prabhu et al (404) y ponen de manifiesto el importante papel de los RE y su gen *ESR1* en la tumorigénesis en el carcinoma de mama, a través de sus funciones en el ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN. Nuestros resultados también están de acuerdo con los aportados por Chen et al (405), que han encontrado asociación entre los fenotipos moleculares luminales y con mejor pronóstico y los de Prabhu et al (404), que establecen una relación directa entre el carcinoma de mama RE+ y supervivencia ($p < 0,001$), subrayando el importante papel de los RE como indicador predictivo (406).

Hosoda (407) y Saini et al (408), en base a un estudio comparativo en los niveles de expresión de genes sensibles a estrógenos (FOXA1, GATA3 o PGR) en mujeres pre y postmenopáusicas, han encontrado relación entre el carcinoma de mama RE+ y el estado post-menopáusico de la paciente.

La expresión de RE en el carcinoma de mama también se ha relacionado con la modalidad y respuesta al tratamiento; Weigell et al (302) han encontrado asociación entre carcinomas RE+ y una mejor respuesta al tratamiento con Tamoxifeno y, por otro lado, Noorasmaliza (402) entre carcinomas RE- y una mejor respuesta a la quimioterapia, y lo relaciona con una mayor probabilidad de remisión completa de la enfermedad tras completar el tratamiento (402).

La proteína **P53** es una proteína supresora del crecimiento tumoral, codificada por el gen *TP53*, que actúa como regulador central del estrés celular y puede activarse a través de la anoxia, señal inadecuada de oncogenes o lesión del ADN. La p53 activada regula la transcripción de genes que participan en la detección del ciclo celular (CDKN1A-p21-), la reparación del ADN (GADD45), la apoptosis (BAX) y la senescencia.

Nuestros resultados señalan que la expresión de p53 se asocia significativamente con la mortalidad y la recidiva, con un incremento del riesgo de casi el doble.

Estos resultados están de acuerdo con lo previamente señalado por Kumar et al (409) y ponen de relieve el importante papel de la p53 en el control del ciclo celular y tumorigénesis en el cáncer de mama. Resultados semejantes se obtienen mediante la activación prolongada de p53 no mutado, que revierte las funciones protectoras del mismo.

La expresión de p53 también se asocia al fenotipo molecular. En este sentido, Sarode et al (305) han encontrado asociación con el grado tumoral y fenotipo molecular, de tal modo que los tumores de alto grado y fenotipos HER2 o basal-like muestran sobreexpresión, y las lesiones de bajo grado y fenotipo luminal presentan ausencia de la misma. Tsikitis et al (322) y Wiechmann et al (323) han señalado asociación entre expresión de p53, ausencia de expresión (RE-/RP-) y elevado índice de proliferación celular (Ki67).

5.2 Estudio Univariante moléculas No representativas

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación significativa entre recidiva y/o mortalidad y las siguientes moléculas: e-cadherina, twist, c-kit, RKIP, caveolina, CD44, ABCG2, HER2, CXCR4, CD10 y survivina.

La **E-CAHDERINA** es una glucoproteína que permite la formación de adherencias intercelulares dependientes de calcio, con la finalidad de facilitar la comunicación intercelular y mantener la arquitectura tisular epitelial.

Keller et al (30) relacionaron la expresión aberrante de E-cadherina en neoplasias de diferentes localizaciones, así como su pérdida de expresión en carcinomas con un patrón marcadamente infiltrativo, con escasa cohesión celular, como el carcinoma lobulillar de mama y el carcinoma gástrico de tipo difuso. Resultados similares han sido descritos también por Yoshida et al (26), que han asociado la disminución de la expresión del complejo E-cadherina-catenina con tumores de alto grado, invasión tumoral venosa o siembra peritoneal, metástasis de ganglios linfáticos, hepáticas y óseas.

Nuestros resultados no coinciden con lo descrito en la literatura, ya que no hemos encontrado asociación significativa entre la ausencia de expresión de E-CADHERINA y riesgo de recidiva y/o mortalidad. Estos hallazgos pueden tener su explicación en el fundamento del estudio inmunohistoquímico, que solamente es capaz de valorar la integridad estructural de la molécula, pero no su funcionalidad. Así, un complejo E-cadherina-catenina estructuralmente íntegro no garantiza su funcionalidad. Esta observación ha sido previamente comunicada por diferentes autores (410,411). Una explicación alternativa es la aportada por Gunji et al (412), que comprobó la conservación del sistema E-cadherina-catenina en las metástasis hepáticas del carcinoma de páncreas. Una disfunción parcial o temporal del sistema en los primeros momentos del proceso de invasión, que permitiera la liberación del grupo celular metastásico, podría explicar la presencia de metástasis en un tumor con expresión aparentemente conservada del sistema E-cadherina-catenina. Una tercera hipótesis implicaría un fallo en los sistemas de unión célula-matriz extracelular (413), que permitiera la liberación de grupos de células neoplásicas desde la localización del tumor primario. De hecho, se ha descrito la presencia de metástasis hepáticas en carcinomas gástricos diferenciados con sistemas de unión intercelular preservados.

La proteína **TWIST** es uno de los reguladores genéticos más importantes de la morfogénesis embrionaria, a través de la puesta en marcha de la transición epitelio mesenquimal y el favorecimiento de la emigración de las células neoplásicas.

Vernon et al (23) y Puisieux et al (24) relacionaron la sobreexpresión de TWIST con la invasión de las células neoplásicas y la metástasis de ganglios linfáticos en el cáncer de mama.

Nuestros hallazgos no coinciden con lo referido en la mayor parte de la literatura, ya que no muestran asociación significativa entre expresión de TWIST y riesgo de recidiva y/o mortalidad en el cáncer de mama. No obstante, sí están en consonancia con las publicaciones aparecidas en los últimos años. Camp et al (414) han señalado que la falta de influencia de la expresión del marcador en el pronóstico del paciente podría estar en relación con la heterogeneidad histológica característica del cáncer de mama, ya que la muestra extraída de cada tumor para la construcción de la matriz tisular podría ofrecer una imagen no representativa de la totalidad de la tumoración.

El **C-KIT** es un receptor transmembrana tirosínquinasa que interviene, entre otras funciones, en el desarrollo y mantenimiento del epitelio glandular mamario.

Simon et al (172) encontraron asociación entre expresión de C-KIT y grado de malignidad tumoral, de tal modo que el tejido mamario no patológico muestra sobreexpresión y el carcinoma infiltrante una expresión reducida o ausente. Resultados similares han sido descritos por Tsutsui (181), que ha asociado la ausencia de expresión de C-KIT con las metástasis en ganglios linfáticos.

Nuestros resultados no coinciden con lo reflejado en la mayor parte de la literatura, ya que no hemos encontrado relación significativa entre C-KIT y las variables de recidiva y mortalidad. No obstante, sí están en consonancia con las publicaciones aparecidas en los últimos años. Raihanatou D. et al (161) han descrito una expresión aberrante de C-KIT hasta en un 14% de los carcinomas infiltrantes de mama. Esta teoría es reforzada por Kanaphaty (415), que señala una posible conservación aberrante de C-KIT en el carcinoma de mama de estadio avanzado, el cual relaciona, junto a otras moléculas de mal pronóstico como CK5/6 y EGFR, con el cáncer de mama fenotipo molecular basal-like o triple negativo.

El **CD44** es una glicoproteína transmembrana que se une al hialuronato formando el complejo ácido hialurónico-CD44. Su acción es inducir a la propagación y migración de las células tumorales.

Díaz (141) ha encontrado sobreexpresión de CD44 con el carcinoma de mama, y ausencia o disminución en el tejido mamario normal.

Nuestros resultados no muestran relación significativa entre CD44 y las variables de recidiva y mortalidad, por lo que no reflejan lo referido en la mayor parte de la literatura. No obstante, sí están en consonancia con trabajos publicados en los últimos años. Morris et al (152) han relacionado la heterogeneidad de los métodos de evaluación de expresión inmunohistoquímica con resultados obtenidos y han señalado la falta de información certera y específica que aporta CD44. Esto pone en duda su valor pronóstico individual y lo limita a marcador acompañante de otros marcadores pronósticos ya consolidados, como los receptores de estrógenos (152).

Con el resto de marcadores evaluados (RKIP, ABCG2, HER2, CXCR4, Caveolina, CD10 y survivina), y a pesar de lo referido en la literatura, no hemos encontrado una relación de asociación significativa con las variables recidiva y mortalidad. Una posible explicación a este hecho podría descansar en el número reducido de casos fallecidos en nuestra serie, o en la heterogeneidad, tanto de pacientes como en el seno de los tumores, o en los métodos de evaluación y puntuación de la tinción inmunohistoquímica que hemos empleado (152, 183, 414).

5.3 Estudio Multivariante

A. RELACIÓN CON RECIDIVA

Nuestros hallazgos señalan una relación significativa entre expresión de TOP2A y RE con la recidiva; de tal modo que la sobreexpresión de ambos marcadores se asocia a una disminución del riesgo de recidiva. Las pacientes con cáncer de mama TOP2A+/RE+ presentan menor riesgo de recidiva que las portadoras de tumores TOP2A+/RE-. Este hecho confirma la influencia de los RE, los cuales potencian el efecto protector de TOP2A frente a la enfermedad.

Estos resultados están en consonancia con lo previamente señalado por Fountzilas et al. (296) que además, han relacionado la expresión TOP2A con otros factores pronósticos, tales como HER2, RE, RP y Ki67, y han asociado los carcinomas de mama RE+/TOP2A+ con tumores de bajo grado, fenotipo molecular luminal, mejor pronóstico y mayor tiempo libre de enfermedad.

Nuestros hallazgos confirman lo publicado en la literatura, y ponen de relieve la co-expresión TOP2A+/RE+ como factor protector y de buen pronóstico frente a la recidiva, en los pacientes con carcinoma infiltrante de tipo no especial (NST).

B. RELACIÓN CON MORTALIDAD

Hemos encontrado asociación significativa entre expresión de C-KIT y RE con la mortalidad; de tal modo que la sobreexpresión de ambos marcadores se asocia a una reducción del riesgo de mortalidad.

Es de destacar que en el estudio univariante no encontramos relación significativa entre C-KIT y la variable mortalidad. Teniendo en cuenta que ambos marcadores sí son significativos de forma conjunta, podríamos concluir que C-KIT es un factor pronóstico dependiente, en cierto grado, de los RE, de modo que éstos últimos potencian el efecto protector de C-KIT frente a la mortalidad.

Estos resultados coinciden con lo previamente referido por Raihanatou et al. (161) que, además, han relacionado la expresión de C-KIT con otros factores pronósticos, tales como HER2, RE y RP, y han asociado su sobreexpresión en carcinomas de mama RE+/RP+ con tumores de bajo grado nuclear y con un mejor pronóstico ($p = 0,001$; $p = 0,006$ respectivamente).

Nuestros resultados confirman lo publicado en la literatura, e indican que la co-expresión C-KIT+/RE+ es un factor de buen pronóstico frente a la mortalidad, en los pacientes con carcinoma infiltrante de tipo no especial (NST).

“Un final feliz depende de donde pares tu historia”

Orson Welles

6. Conclusiones

1. El perfil inmunohistoquímico recomendado para el estudio predictivo del carcinoma de mama incluye a los siguientes marcadores: RE, RP, HER2, FOXA1, TOP2A, p53, Ki67, CK 5/6, CDX2 y FASCINA.
2. La expresión de RE, RP, FOXA1 y TOP2A se asocia con un efecto protector frente a la enfermedad, de manera que la sobreexpresión de RP, FOXA1 y TOP2A se relaciona con un menor riesgo de recidiva, y la de RE con un menor riesgo de recidiva y mortalidad.
3. La expresión de CK5/6, CDX2, FASCINA, Ki67 y p53 tienen, en cambio, un efecto adverso sobre la evolución de la enfermedad, ya que la sobreexpresión de CK5/6, FASCINA y Ki67 se relacionan con un incremento del riesgo de recidiva, la de CDK2 con un mayor riesgo de mortalidad, y la de p53 con un mayor riesgo de recidiva y mortalidad.
4. La co-expresión de TOP2A +/RE+ se asocia a una disminución del riesgo de recidiva. La expresión de RE potencia el efecto protector de TOP2A en el desarrollo y progresión de la enfermedad.
5. La co-expresión C-KIT+/RE+ se asocia a una reducción del riesgo de mortalidad. C-KIT se considera un factor pronóstico dependiente de los RE, potenciando éstos últimos el efecto beneficioso de C-KIT.
6. El resto de marcadores evaluados (E-CADHERINA, TWIST, CD44, RKIP, ABCG2, HER2, CXCR4, CAVEOLINA, CD10 y SURVIVINA) no han mostrado relación significativa alguna con las variables recidiva y mortalidad, de manera que pese a lo referido en la mayor parte de la literatura, la positividad de E-CADHERINA, RKIP y CAVEOLINA, no necesariamente se relaciona siempre con buen pronóstico. De la misma manera, la expresión positiva de TWIST, CD44, ABCG2, HER2, CXCR4, CD10 y SURVIVINA no debe relacionarse por defecto con una mala evolución de la enfermedad.

7. Bibliografía

1. Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM: Breast cancer in Europe. ENCR Cancer Fact Sheets 2002;2:1-4.
2. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. BMC Cancer 2009; 9:188.
3. Bohn O L, Nasir I, Brufsky A, et al. Biomarker profile in breast carcinomas presenting with bone metastasis. Int J Clin Exp Pathol 2010;3:139-146.
4. Liu Y. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. J Exp Clin Cancer Res 2010; 29:16.
5. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. Cancer 1997;80:1588-1594.
6. Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. Clin Exp Metastasis 2008;25:345-356.
7. Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell 2003;3:537-549.
8. Gupta GP, Minn AJ, Kang Y, et al. Identifying site-specific metastasis genes and functions. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005;70:149-158.
9. Kominsky SL, Davidson NE. A "bone" fide predictor of metastasis? Predicting breast cancer metastasis to bone. J Clin Oncol 2006;24:2227-2229.
10. Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 2001;410:50-56.
11. Smid M, Wang Y, Klijn JG, et al. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. J Clin Oncol 2006;24:2261-2267
12. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. J Clin Invest 1996;98:1544-1549.
13. Alberts B, Bray D, Lewis J. et al Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular. En: Alberts B, Editors. Biología molecular de la célula. Barcelona: Ediciones Omega SA; 1996. pp. 1017-1083.

14. Karp G. Interacciones entre las células y su entorno. En: Karp G, Editors. *Biología celular y molecular*. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 1998. pp. 239-274.
15. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, et al. *Molecular cell biology*. 4th. New York: W. H. Freeman; 2000.
16. Cooper G, Hausman RE. *La Célula*. 5th. Madrid: Marbán Libros; 2002.
17. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251: 1451-1455.
18. Menger MD, Vollmar B. Adhesions molecules as determinants of disease: From molecular biology to surgical research. *Br J Surg* 1996;83: 588-601.
19. Takeichi M. Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990;59: 237-252.
20. Shore EM, Nelson WJ. Biosynthesis of cell-cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 1991;266: 19672-19680.
21. Nose A, Tsuji K, Takeichi M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 1990;61: 147-155.
22. Foubert E, De Craene B, Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 2010;12:206.
23. Vernon AE, LaBonne C. Tumor Metastasis: A New Twist on Epithelial–Mesenchymal Transitions. *Current Biology* 2004;14:719-721.
24. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Brit J Cancer* 2006;94:13-17.
25. Kang Y, Massague J. Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis. *Cell* 2004;118:277–279.
26. Yoshida R, Kimura N, Harada Y, et al. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 2001;18:513-520.

27. Grabsch H, Takeno S, Noguchi T, et al. Different patterns of b-catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Histopathology* 2001;39:141-149.
28. Endo K, Ueda T, Ueyama J, et al. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: Relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 2000;31:558-565.
29. Sato H, Hasegawa T, Kanai Y, et al. Expression of cadherins and their undercoat proteins (a-,b-, and g-catenins and p-120) and accumulation of b-catenin with no gene mutations in synovial sarcoma. *Virch Arch* 2001;438: 23-30.
30. Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 1999;155:337-342.
31. Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, et al. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001;439: 725-751.
32. Hosono S, Gross I, English MA, et al. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000;275:10943-10953.
33. Lochter A, Srebrow A, Simpson CJ, et al. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1 dependent invasive properties. *J Biol Chem* 1997; 272:5007-5015.
34. Al Saleh S, Sharaf LH, Luqmani YA. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition. *Inter J Oncol* 2011;38:1197-1217.
35. Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res* 2012;22:90-106.
36. Van Nes J G, De Kruijf E M, Putter H, et al. Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor–positive early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;133:49-59.

37. Yuen HF, Zhang SH, Wong A SY, et al. Regarding “Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients”. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:351-352.
38. Barrett SV. Breast cancer. *J R Coll Physicians Edinb* 2010;40:335-338.
39. Moulder S. Intrinsic resistance to chemotherapy in breast cancer. *Womens Health* 2010; 6:821-830.
40. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
41. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, et al. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998;58:5337-5339.
42. Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59:8-13.
- 43: Xiang L, Su P, Xia S, Liu Z, Wang Y, Gao P, Zhou G. ABCG2 is associated with HER-2 Expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol* 2011;6:90.
44. Knutsen T, Rao VK, Ried T, et al. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes Can* 2000;27:110-116.
45. Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, et al. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Acta Biochim Biophys* 2001;1520:234-241.
46. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001;61:3458-3464.
47. Robey RW, To KK, Polgar O, et al. ABCG2: A perspective. *Adv Drug Deliver Rev* 2009;61:3-13.

48. Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, et al. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:452-458.
49. Faneyte IF, Kristel PM, Maliepaard M, et al. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1068-1074.
50. Burger H, Foekens JA, Look MP, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: Correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003;9:827-836.
51. Su P, Zhang Q, Yang Q. Research Immunohistochemical analysis of Metadherin in proliferative and cancerous breast tissue. *Diagn Pathol* 2010;5:38.
52. Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffinembedded material. *J Pathol* 2002;198:213-219.
53. Bessho Y. Role of ABCG2 as a biomarker for predicting resistance to CPT-11/SN-38 in lung cancer. *Cancer Sci* 2006;97:192-198.
54. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1216-1223.
55. Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, et al. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res* 2004;64:1247-1251.
56. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 2004;279:24218-24225.
57. Szatmari I, Vamosi G, Brazda P, et al. y L: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem* 2006; 281:23812-23823.

58. Couet J, Belanger MM, Roussel E, et al. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:223-235.
59. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, et al. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68:673-682.
60. Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cy* 1955;1:445-458.
61. Palade, G. E. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953;24:1424-1436.
62. Fra, AM., Williamson, E, Simons, K, et al. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression. *Canc Met Rev* 2008;27:715-735.
63. Williams TM, Lisanti, M.P. The Caveolin genes: From cell biology to medicine. *Ann Med* 2004;36:584-895.
64. Scherer PE., Lewis RY, Volonte D., Engelman, et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:29337-29346.
65. Razani, B. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 2002;22: 2329-2344.
66. Lahtinen U, Honsho M, Parton R.G, et al. Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. *FEBS Lett* 2003;538:85-88.
67. Way M., Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 1995;376:108-112.
68. Silva WI, Maldonado HM, Lisanti MP, et al. Identification of caveolae and caveolin in C6 glioma cells. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:705-714.
69. Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, et al. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 2001;276:21425-21433.
70. Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 2005;88:494-506.

71. Engelman JA, Lee RJ, Karnezis A, et al. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem* 1998;273:20448-20455.
72. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara, et al. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997;272:16374-16781.
73. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters B S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:25437-25440.
74. Zhang X, Ling MT, Wang Q, et al. Identification of a novel inhibitor of differentiation-1 (ID-1) binding partner, caveolin-1, and its role in epithelial-mesenchymal transition and resistance to apoptosis in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:33284-33294.
75. Fernandez MA. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006;313:1628-1632.
76. Drab M. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in Caveolin-1 gene-disrupted mice. *Cancer Met Rev* 2008;27:715-735.
77. Schubert W, Frank PG, Razani B, et al. Deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:48619-48622.
78. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825-1834.
79. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 2002;3:311-320.
80. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, et al. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 2007;81:8552-8562.
81. Juhasz M, Chen J, Tulassay Z, et al. Expression of caveolin-1 in gastrointestinal and extraintestinal cancers, *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 2003;129:493-497.

82. Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, et al. Caveolin and cancer: a complex relationship. In: M.P. Mattson, Editors. *Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine*. Totowa: Humana Press; 2004. pp. 161-190.
83. Ando T, Ishiguro H, Kimura M, et al. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18:601-609.
84. Yoo SH, Park YS, Kim HR, et al. Expression of caveolin-1 is associated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2003;42:195-202.
85. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol Chem* 1998;273:32380-32383.
86. Yang CP, Galbiati F, Volonte D, et al. Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells. *FEBS Lett* 1998;439:368-372.
87. Belanger MM, Roussel E, Couet J. Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells. *Anticancer Drugs* 2003;14:281-287.
88. Sedding DG, Hermsen J, Seay U, et al. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ. Res* 2005;96:635-642.
89. Cordes N, Frick S, Brunner TB, et al. Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene* 2007;26:6851-6862.
90. Fiucci G, Ravid D, Reich R, et al. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:2365-2375.
91. Ravid D, Maor S, Werner H, et al. Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene* 2005;24:1338-1347.
92. Glait C, Tencer L, Ravid D, et al. Caveolin-1 up-regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells via Sp1- and p53-dependent pathways. *Exp Cell Res* 2006;312:3899-3908.

93. Campbell L, Gumbleton M, Griffiths DF. Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2003;89:1909-1913.
94. Horiguchi A, Asano T, Asakuma J, et al. Impact of caveolin-1 expression on clinicopathological parameters in renal cell carcinoma, *J. Urol* 2004;172:718-722.
95. Yang G, Addai J, Wheeler TM, et al. Correlative evidence that prostate cancer cell-derived caveolin-1 mediates angiogenesis. *Hum. Pathol* 2007;38:1688-1695.
96. Ho CC, Huang PH, Huang HY, et al. Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 2002;161:1647-1656.
97. Kato T, Miyamoto M, Kato K, et al. Difference of caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Cancer Lett* 2004;214:121-128.
98. Murakami S, Miyamoto M, Hida Y, et al. Caveolin I overexpression is a favourable prognostic factor for patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:1234-1238.
99. Shi L, Chen XM, Wang L, et al. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome. *Cancer* 2007;109:1523-1531.
100. Van Golen KL. Is caveolin-1 a viable therapeutic target to reduce cancer metastasis?, *Expert Opin Ther Targets* 2006;10:709-721.
101. Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO. A role for caveolae in cell migration, *FASEB J* 2004;18:1801-1811.
102. Salanueva IJ, Cerezo A, Guadamillas MC, et al. Integrin regulation of caveolin function, *J Cell Mol Med* 2007;11:969-980.
103. Del Pozo MA, Schwartz MA. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins, *Trends Cell Biol* 2007;17:246-250.

104. Mercier I, Jasmin JF, Pavlides S, et al. Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Lab Invest* 2009;89:614-623.
105. Carver LA, Schnitzer JE. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 2003;3:571-581.
106. Patani N, Martin LA, Reis-Filho JS, et al. The role of caveolin-1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:1-15.
107. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, et al. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch* 2002;440:589-593.
108. Mumford RA, Pierzchala PA, Strauss AW, et al. Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones. *Proc Natl Acad Sci* 1981;78:6623-6627.
109. Patey G, De La Baume S, Schwartz JC, et al. Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science* 1981;212:1153-1155.
110. Greaves MF, Hariri G, Newman RA, et al. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 1983;61:628-639.
111. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000;6:149-156.
112. Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 1996;3:895-904.
113. Iezzi G, Piattelli A, Rubini C et al. CD10 expression in stromal cells of ameloblastoma variants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:206-209.
114. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, et al. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol* 2007;20:84-89.

115. Albrecht M, Gillen S, Wilhelm B, et al. Expression, localization and activity of neutral endopeptidase in cultured cells of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 2002;168:336-342.
116. Abdou AG. CD10 expression in tumour and stromal cells of bladder carcinoma: an association with bilharziasis. *APMIS* 2007;115:1206-1218.
117. Huang WB, Zhou XJ, Chen JY et al. CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. *Jpn J Clin. Oncol* 2005;35:245-250.
118. Ogawa H, Iwaya K, Izumi M et al. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Hum Pathol* 2002;33:806-811.
119. Albores-Saavedra J, Dorantes-Heredia R, Chablé-Montero F, et al. Endometrial Stromal Sarcomas: Immunoprofile With Emphasis on HMB45 Reactivity. *Am J Clin Pathol* 2014;141:850-855.
120. Tian W, Latour M, Epstein JI. Endometrial stromal sarcoma involving the urinary bladder: a study of 6 cases. *Am J Surg Pathol* 2014;38:982-989. .
121. Braham H, Trimeche M, Ziadi S, et al. CD10 expression by fusiform stromal cells in nasopharyngeal carcinoma correlates with tumor progression. *Virchows Arch* 2006;449:220-224.
122. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, et al. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000;24:203-210.
123. Chu P, Arber DA. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113:374-382.
124. Koiso K, Akaza H, Ohtani M, et al. A new tumor marker for bladder cancer. *Int J Urol* 1994;1:33-36.
125. Kim H-S. Stromal CD10 expression and relationship to the E cadherin/b-catenin complex in breast carcinoma, *Histopathology* 2010;56:708-719.

126. Bains AS, Sidhu JS, CD10 positivity in breast epithelial neoplasms. *J Clin Pathol* 2007;60:958-959.
127. Gusterson BA, Monaghan P, Mahendran R, et al. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:343-349.
128. Tse GM, Tsang AK, Putti TC, et al. Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. *J Clin Pathol* 2005;58:185-189.
129. Ohji Y, Yao T, Eguchi T et al. Evaluation of risk of liver metastasis in colorectal adenocarcinoma based on the combination of risk factors including CD10 expression: multivariate analysis of clinicopathological and immunohistochemical factors. *Oncol Rep* 2007;17:525-530.
130. Tokuhara T, Adachi M, Hashida H, et al., Neutral endopeptidase/ CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovascular Surg* 2001;49:489-496.
131. Puri V, Jain M, Thomas S. Stromal Expression of CD10 in Invasive Breast Carcinoma and Its Correlation with ER, PR, HER2-neu, and Ki67. *Inter J Breast Cancer* 2011; 2011:1-4.
132. Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Exp Mol Pathol* 1999;66:149-156.
133. Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241-319.
134. Goodison S, Urquidí V, Tarín D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999;52:189-196.
135. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998;51:191-200.
136. Yang B, Yang BL, Savani RC, et al. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBOJ* 1994;13:286-296.

137. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* 2004;117:373-380.
138. Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol* 2000;156:529-536.
139. Screaton GR, Bell MV, Jackson DG et al. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:12160-121634.
140. Tblg C, Hofmann M, Herrhch P, et al. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1225-1229.
141. Diaz LK. CD44 Expression Is Associatedwith Increased Survival in Node-Negative Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:3309-3314.
142. Giinthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
143. Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-V6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994;344:1470-1472.
144. Jansen RHJ. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol* 1998;9:109-111.
145. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, et al. CD44variant isoforms innon-Hodgkin's lymphoma: a newindependent prognostic factor. *Blood* 1995;85:2885-2899.
146. Barbour AP, Reeder JA, Walsh MD, et al. Expression of the CD44v2-10 isoform confers a metastatic phenotype: importance of the heparan sulfate attachment site CD44v3. *Cancer Res* 2003;63:887-892.
147. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990;61:1303-1313.
148. Bennett KL, Modrell B, Greenfield B, et al. Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variablysplicedexons. *J Cell Biol* 1995;131:1623-1633.

149. Arch R, Wirth K, Hofmann M, et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992;257:682-685.
150. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
151. Sheen-Chen SM, Chen WJ, Eng HL, et al. Evaluation of the prognostic value of serum soluble CD44 in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 1999;17:581-585.
152. Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R, et al. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:527-531.
153. Regidor PA, Callies R, Regidor M, et al. Expression of the CD44 variant isoforms 6 and 4/5 in breast cancer - correlation with established prognostic parameters. *Arch Gynecol Obstet* 1996;258:125-135.
154. Tempfer C, Losch A, Heinzl H et al. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32:2023-2025.
155. Tokue Y, Matsumura Y, Katsumata N, et al. CD44 variant isoform expression and breast cancer prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:283-290.
156. Culty M, Shizari M, Thompson EW, et al. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* 1994;160:275-286.
157. Jansen RH, Joosten-Achjanie SR, Arends JW, et al. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol* 1998;9:109-111.
158. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, et al. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:5424-5433.

159. Aceituno E, Turrion F, San Roman JM, et al. Expression of CD44 variant v6 in breast carcinoma and its relationship with other parameters of tumor biology. *Med Clin* 1998;111:168-171.
160. Hefler L, Tempfer C, Haeusler G, et al. Cytosol concentrations of CD44 isoforms in breast cancer tissue. *Int J Cancer* 1998;79:541-545.
161. Raihanatou D, Achim R, Christian J, et al. C-KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu. *Human Pathology* 2006;37:205-211.
162. Qiu E, Ray P, Brown K, et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family – oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 1988;7:1003-1011.
163. Zsebo KM, Williams D, Geissler E, et al. Stem cell factor is encoded at the S/locus of the mouse and is the ligand for the c-KIT tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213-224.
164. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, et al. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002;33:484-495.
165. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/ c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2535-2548.
166. Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, et al. Expression of the ckit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 1993;142:339-346.
167. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, et al. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1417-1425.
168. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580.
169. Wang C, Curtis J, Geissler E, et al. The expression of the proto-oncogene c-KIT in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989;3:699-702.

170. Plummer H, Catlett J, Leftwich J, et al. c-myc expression correlates with suppression of c-KIT proto-oncogene expression in small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;53:4337-4342.
171. Tian Q, Frierson HF, Krystal GW, et al. Activating c-KIT gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999;154:1643-1647.
172. Simon R, Panussis S, Maurer R, et al. KIT(CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res* 2004;10:178-183.
173. Natali PG, Nicorta MR, Sures I, et al. Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer* 1992;52:713-717.
174. Tsuura Y, Suzuki T, Honma K, et al. Expression of c-kit protein in proliferative lesions of human breast: sexual difference and close association with phosphotyrosine status. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:239-246.
175. Ulivi P, Zoli W, Medri L, Amadori, et al. c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:33-42.
176. Yared MA, Middleton LP, Bernstam FM, et al. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast tissue. *Breast J* 2004;10:323-327.
177. Miliaras D, Karasavvidou F, Papanikolaou A, et al. KIT expression in fetal, normal adult, and neoplastic renal tissues. *J Clin Pathol* 2004;57:463-466.
178. Terada T. Protein expression and gene mutation status of KIT and PDGFRA in renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2012;27:297-302.
179. Ko CD, Kim JS, Ko BG, et al. The meaning of the c-KIT protooncogene product in malignant transformation in human mammary epithelium. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:593-597.
180. Chui X, Egami H, Yamashita J, et al. Immunohistochemical expression of the c-KIT proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer* 1996;73:1233-1236.
181. Tsutsui S, A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94:1874-1878.

182. Charpin C. Quantitative immunohistochemical expression of c Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. *Br J Cancer* 2009;101:48-54.
183. Tsuda H, Morita D, Kimura M, et al. Correlation of KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer Sci* 2005;96:48-53.
184. Scobie JV, Acs G, Bandera CA, et al. C-Kit immunoreactivity in endometrial adenocarcinomas and its clinicopathologic significance. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:149-155.
185. Bar-Sela G, Kuten A, Ben-Eliezer S, et al. Expression of HER2 and C-KIT in nasopharyngeal carcinoma: implications for a new therapeutic approach. *Mod Pathol* 2003;16:1035-1040.
186. Pan C, Yang XJ, Lopez-Beltran A, et al. c-kit expression in small cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005;18:320-323.
187. Tonary AM, Macdonald EA, Faught W, et al. Lack of expression of c-kit in ovarian cancers is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2000;89:242-250.
188. Krams M, Parwaresch R, Sipos B, et al. Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. *Oncogene* 2004;23:588-595.
189. Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. C-kit expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and monomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:586-593.
190. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;71:67-75.
191. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-5374.

192. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:10869-10874.
193. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001;54:229-235.
194. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103-112.
195. Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, et al. Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and post-menopausal breast cancer. *Virchows Arch* 2006;448:539-544.
196. Simin K, Wu H, Lu L, et al. pRb Inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PLoS Biol* 2004;2:22.
197. Cangi MG, Cukor B, Soung P, et al. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J Clin Invest* 2000;106:753-761.
198. Cordon-Cardo C. Mutation of cell-cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995;147:545-560.
199. Wang Y, Becker D. Differential expression of the cyclindependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 1996;12:1069-1075.
200. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-582.
201. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995;11:136-140.
202. Hinds PW, Weinberg RA. Tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:135-141.

203. Reznitzky D, Gossen M, Bujard H, et al. Acceleration of the G/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994;14:1669-1679.
204. Paternelli P, Flejou JF, De Mitri MS, et al. Structure and expression of the cyclin A gene in human primary liver cancer. Correlation with low cytometric parameters. *J Hepatol* 1995;23:47-52.
205. Bukholm IR, Bukholm G, Nesland JM. Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:283-287.
206. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109-118.
207. Akli S, Keyomarsi K. Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2:38-47.
208. Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin E and prognosis in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1546-1547.
209. Kuz'bicki L, Lange D, Stanek-Widera A, et al. Cyclin-dependent Kinase 2 (CDK-2) expression in nonmelanocytic human cutaneous lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:357-364.
210. Roberts JM, Sherr CJ. Bare essentials of CDK2 and cyclin E. *Nat Genet* 2003;35:9-10.
211. Shanahan F, Seghezzi W, Parry D, et al. Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of brg1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol* 1999;19:1460-1469.
212. Chen SJ, Nakahara T, Takahara M, et al. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2. *Br J Dermatol* 2009;160:442-445.
213. Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y, et al. Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:68-72.

214. Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin over-expression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1112-1116.
215. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, et al. High cyclin E and low p27/ Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2001;34:59-65.
216. Dong Y, Sui L, Tai Y, et al. Prognostic significance of cyclin E overexpression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:4253-4258.
217. Mihara M, Shintani S, Nakahara Y, et al. Overexpression of CDK2 Is a prognostic indicator of oral cancer progression. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:352-360.
218. Oshita T, Shigemasa K, Nagai N, et al. p27, cyclin E, and CDK-2 expression in normal and cancerous endometrium. *Int J Oncol* 2002;21:737-743.
219. Kato N, Watanabe J, Jobo T, et al. Immunohistochemical expression of cyclin E in endometrial adenocarcinoma (endometrioid type) and its clinicopathological significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:222-226.
220. Li SF, Shiozawa T, Nakayama K, et al. Stepwise abnormalities of sex steroid hormone receptors, tumour suppressor gene products (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *American Cancer Society* 1996;77:321-329.
221. Courjal F, Louason G, Speiser P, et al. Cyclin gene amplification and over-expression in breast and ovarian cancers. Evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumours. *Int J Cancer* 1996;69:247-253.
222. Kuz'bicki Ł, A"adowicz E, Chwirot BW. Cyclin-dependent kinase 2 expression in human melanomas and benign melanocytic skin lesions. *Melanoma Res* 2006;16:435-444.
223. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, et al. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte i). *Actas Dermosifiliogr* 2013;104:99-127.
224. Wasserman J, Maddox J, Racz M, et al. Update on immunohistochemical methods relevant to dermatopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1053-1061.

225. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-439.
226. Ramírez AK. Carcinoma de la mama triple negativo. Aspectos morfológicos y expresión de Ck5/6. *Rev Venez Oncol* 2011;23:2-13.
227. Bhargava R, Beriwal S, McManus K, et al. CK5 is more sensitive then CK 5/6 in identifying the “Basal-like” phenotype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2008;130:724-730.
228. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002;161:1991-1996.
229. Buys DLJ, Zarate A. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de las células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímico en 54 casos triple negativos. *Patología* 2008;46:303-308.
230. Bhargava R, Striebel J, Sushil B, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int Clin Exp Pathol* 2009;2:444-455.
231. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:264-271.
232. Diaz Lk, Cryns VL, Symmans WF, et al. Triple negative carcinoma and the basal phenotype: From expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol* 2007;14:419-430.
233. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-56.
234. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenv. *Blood* 2006;107:1761-1767.
235. Andre F, Cabioglu N, Assi H, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol* 2006;17:945-951.

236. Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1835-1841.
237. Salvucci O. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat* 2006;97:275-283.
238. Zhuo W. The CXCL12–CXCR4 Chemokine Pathway: A novel axis regulates lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2012;18:5387-5398.
239. Parker CC. The Chemokine Receptor CXCR4 as a Novel Independent Prognostic Marker for Node-Positive Breast Cancer Patients. *J Surg Oncol* 2012;106:393-398.
240. Hu X, Dai S, Wu WJ, et al. Stromal cell-derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell-derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation* 2007;116:654-663.
241. Singh S, Srivastava SK, Bhardwaj A, et al. CXCL12– CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. *Br J Cancer* 2010;103:1671-1679.
242. Andre F, Xia W, Conforti R, et al. CXCR4 Expression in Early Breast Cancer and Risk of Distant Recurrence. *Oncologist* 2009;14:1182-1188.
243. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clin Exp Metastasis* 2008;27:97-105.
244. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol* 2001;167:4747-4757.
245. Chu Q D, Panu L, Holm NT, et al. High Chemokine Receptor CXCR4 Level in Triple Negative Breast Cancer Specimens Predicts Poor Clinical Outcome. *J Surg Res* 2010;159:689-695.
246. Hao L. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2007;253:34-42.
247. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550-563.

248. Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, et al. Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol* 2008;39:1751-1755.
249. Hu J, Deng X, Bian X, et al. The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:4658-4665.
250. Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, et al. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1682-1689.
251. Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2006;6:290-296.
252. Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1743-1750.
253. Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1890-1909.
254. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:558-564.
255. Guo W, Giancotti FG. Integrin signaling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:816-826.
256. Friedl P, Wolf K. Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-374.
257. Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: A place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 2004;14:241-249.
258. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: Prospects for a novel biomarker?. *Inter J Biochem Cell Biol* 2005;37:1787-1804.

259. Adams JC, Schwartz MA. Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 2000;150:807-822.
260. Jayo A, Parsons M. Fascin: A key regulator of cytoskeletal dynamics. *Inter J Biochem Cell Biol* 2010;42:1614-1617.
261. De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Adams JC. Expression of fascin-1, the gene encoding the actin-bundling protein fascin-1, during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 2004;4:637-643.
262. Goncharuk VN, Ross JS, Carlson JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *J Cutan Pathol* 2002;29:430-438.
263. Jawhari AU, Buda A, Jenkins M., et al. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation in vitro. *Am J Pathol* 2003;162:69-80.
264. Xing P. Fascin, an actin bundling protein, promotes breast cancer progression in vitro. *Cell Biochem Funct* 2011;29:303-310.
265. Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, et al. Fascin, an actinbundling protein associated with cell motility, is up regulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer* 2000;83:870-873.
266. Qualtrough D, Singh K, Banu N, et al. The actinbundling protein fascin is overexpressed in colorectal adenomas and promotes motility in adenoma cells in vitro. *Br J Cancer* 2009;101:1124-1129.
267. Darnel AD, Behmoaram E, Vollmer RT, et al. Fascin regulates prostate cancer cell invasion and is associated with metastasis and biochemical failure in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:1376-1383.
268. Adams JC. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Current Opinion in Cell Biology* 2004;16:590-596.
269. Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, et al. Prognostic significance of fascin over-expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:2597-2605.

270. Yoder BJ, Tso E, Skacel M, et al. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. *Clin Cancer Res* 2005;11:186-192.
271. Huang X. Fascin and cortactin expression is correlated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroen Hepat* 2012;24:633-639.
272. Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, et al. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. *Oncology* 2004;67:262-270.
273. Al-Alwan M, Olabi S, Ghebeh H, et al. Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. *PLoS ONE* 2011;6:1-12.
274. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:1533-1539.
275. Hannenhalli S, Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat. Rev Genet* 2009;10:233-240.
276. Costa RH, Grayson DR, Darnell JE. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and α 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 1989;9:1415-1425.
277. Habashya HO, Powea DG, Rakhaa EA, et al. Forkhead-box A1 (FOXA1) expression in breast cancer and its prognostic significance. *Eur J Cancer* 2008;44:1541-1551.
278. Lin L, Miller CT, Contreras JI, et al. The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3 alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2002;62:5273-5279.
279. Wolf I, Bose S, Williamson EA, et al. FOXA1: growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1013-1022.
280. Bernardo GM, Keri RA. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biopci Rep* 2012;32:113-130.

281. Kaestner KH. The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:281-285.
282. Tomaru Y, Kondo S, Suzuki M, et al. A comprehensive search for HNF-3a-regulated genes in mouse hepatoma cells by 60K cDNA microarray and chromatin immunoprecipitation/PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:667-674.
283. Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, et al. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* 2002;9: 279-289.
284. Serandour AA, Avner S, Percevault F, et al. Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res* 2011;21:555-565.
285. Laganier J, Deblois G, Lefebvre C, et al. From the cover: location analysis of estrogen receptor target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:11651-11656.
286. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 2007;9:201-209.
287. Kouros-Mehr H, Slorach EM., Sternlicht MD, et al. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006;127:1041-1055.
288. Bernardo GM, Lozada K, Miedler JD, et al. FOXA1 is an essential determinant of ER α expression and mammary ductal morphogenesis. *Development* 2010;137:2045-2054.
289. Mehta RJ, Jain RK, Leung S, et al. FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:881-890.
290. Thorat MA, Marchio C, Morimiya A, et al. Forkhead box A1 expression in breast cancer is associated with luminal subtype and good prognosis. *J Clin Pathol* 2008;61:327-332.

291. Albergaria A, Paredes J, Sousa B, et al. Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumours. *Breast Cancer Res* 2009;11:40.
292. Hisamatsu YE, Tokunaga N, Yamashita S, et al. Impact of FOXA1 Expression on the Prognosis of Patients with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Yuichi Hisamatsu. *Ann Surg Oncol* 2012;19:1145-1152.
293. Badve S, Turbin D, Thorat MA, et al. FOXA1 Expression in Breast Cancer Correlation with Luminal Subtype A and Survival. *Clin Cancer Res* 2007;13:4415-4421.
294. Nakshatri H, Badve S. FOXA1 as a therapeutic target for breast cancer. *Expert opinion on Therapeutic Targets* 2007;11:507-514.
295. Bruck P, Vilches N, Ramos E, et al. Expresión del her2neu en el adenocarcinoma ductal de la glándula mamaria: correlación con parámetros histológicos y expresión de receptores estrogénicos en pacientes mexicanas. *Ginecol Obstet Mex* 2006;74:516-522.
296. Fountzilas G, Valavanis C, Kotoulas V, et al. HER2 and TOP2A in high-risk early breast cancer patients treated with adjuvant epirubicin-based dose-dense sequential chemotherapy. *J Translation Med* 2012;10:10.
297. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14:320-368.
298. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
299. Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and Topoisomerase II α Gene Amplification and Protein Expression in Invasive Breast Carcinomas Chromogenic In Situ Hybridization and Immunohistochemical Analyses. *Am J Clin Pathol* 2005;123:889-895.
300. Vilches Cisneros N, Barboza Quintana O, Ancer Rodríguez J, et al. Aplicaciones prácticas de la inmunohistoquímica en la patología de la glándula mamaria. *Patología* 2010;48:194-203.

301. Konency GE, Pauletti G, Pegram M. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormonereceptors in hormone receptor positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:142-153.
302. Weigell MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Related Cancer* 2010;17:245-262.
303. Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3846-3852.
304. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26:1059-1065.
305. Sarode VR, Han JS, Morris DH, et al. A Comparative analysis of biomarker expression and molecular subtypes of pure ductal carcinoma in situ and invasive breast carcinoma by image analysis: Relationship of the subtypes with histologic grade, Ki67, p53 overexpression, and DNA ploidy. *Inter J Breast Cancer* 2011;2011:1-7.
306. Jarvinen TA, Liu ET. Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes—molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Current cancer drug targets* 2006;6:579-602.
307. Konency GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. HER2/neu gen amplification and response to paclitaxel in patients with metastasic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1141-1151.
308. Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 2000;103:57-75.
309. Farzand S, Siddique T, Saba K, et al. Frequency of HER2/neu overexpression in adenocarcinoma of the gastrointestinal system. *World J Gastroenterol* 2014;20:5889-5896.

310. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
311. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. ASCO/CAP HER2 Testing Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:241-256.
312. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Nat Cancer Inst* 2008;100:14-20.
313. Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, et al. Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin. *Int J Cancer* 2003;105:568-573.
314. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, et al. Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial *Lancet Oncol* 2010;11:266-274.
315. Gramatyka M. Cardiotoxicity as undesired side effect in the treatment of breast cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014;68:483-498.
316. Han Y, Zhang JP, Qian JQ, et al. Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). *J Appl Toxicol* 2014.
317. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 1991;12:42-49.
318. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-7220.
319. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G , et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Brit J Cancer* 2007;96:1504-1513.
320. Jones RL, Salter J, A'Hern R, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;11:53-68.

321. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 2007;99:167-170.
322. Tsikitis VL, Chung MA. Biology of ductal carcinoma in situ classification based on biologic potential. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials* 2006;29:305-310.
323. Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer* 2008;112:2130-2142.
324. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principios de bioquímica*. 3th. Ed. Barcelona: Omega; 2001.
325. Signoretti S. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002;110:633-641.
326. Byar DP, Sears ME, McGuire WL. Relationship between estrogen receptor values and clinical data in predicting the response to endocrine therapy for patients with advanced breast cancer. *European Journal of Cancer* 1979;15:299-310.
327. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifentreated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-2826.
328. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *J Clin Oncol* 2008;26:1059-1065.
329. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 2004;10:6622-6628.
330. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nature Genetics* 2007;39:655-660.
331. Brown LA, Hoog J, Chin SF, et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nature Genetics* 2008;40:806-807.

332. Reis-Filho JS, Drury S, Lambros MB, et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nature Genetics* 2008;40:809-810.
333. Guerra Araiza C, Camacho Arroyo I. Las isoformas del receptor de progesterona: función y regulación. *Rev Invest Clin* 2000;52:686-691.
334. Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 2006;17:818-826.
335. Kim HS, Lee SH, Won KY, et al. Expression of Raf-1 kinase inhibitory protein in carcinoma of the ampulla of Vater. *Virch Arch* 2012;460:61-68.
336. Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:878-889.
337. Park S, Yeung ML, Beach S, et al. RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 2005;24:3535-3540.
338. Odabaei G, Chatterjee D, Jazirehi AR, et al. Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. *Adv Cancer Res* 2004;91:169-200.
339. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2001;21:7207-7217.
340. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, et al. Raf kinase inhibitor protein expression in survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:5672-5679.
341. Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2007;127:820-827.
342. Chatterjee D, Sabo E, Tavares R, et al. Inverse association between Raf kinase inhibitory protein and signal transducers and activators of transcription 3 expression in gastric adenocarcinoma patients: implications for clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14:2994-3001.

343. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:7392-7397.
344. Chen Y, Ouyang GL, Yi H, Identification of RKIP as an invasion suppressor protein in nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis. *J Proteome Res* 2008; 7:5254-5262.
345. Schuierer MM, Bataille F, Hagan S, et al. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer Res* 2004;64:5186-5192.
346. Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:878-889.
347. Li HZ, Wang Y, Gao Y, et al. Effects of Raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2008; 6:917-928.
348. Wang Y, Gao Y. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2008;6:917-928.
349. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:7392-7397.
350. Kim HS, Kim GY, Lim SJ, et al. Loss of Raf-1 kinase inhibitory protein in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology* 2010;42:655-660.
351. Kim HS, Kim GY, Lim SJ, et al. Reduced expression of Raf-1 kinase inhibitory protein is a significant prognostic marker in patients with gallbladder carcinoma. *Hum Pathol* 2010;41:1609-1616.
352. Martinho O, Gouveia A, Silva P, et al. Loss of RKIP expression is associated with poor survival in GISTs. *Virch Arch* 2009;455:277-284.
353. Wang J, Yang YH, Wang AQ, et al. Immunohistochemical detection of the Raf kinase inhibitor protein in nonneoplastic gastric tissue and gastric cancer tissue. *Med Oncol* 2010;27:219-223.

354. Zaravinos A, Chatziioannou M, Lambrou GI, Implication of RAF and RKIP Genes in Urinary Bladder Cancer. *Pathol Oncol Res* 2011;17:181-190.
355. Gao Ch, Pang L, Ren Ch, et al. Prognostic Value of Raf Kinase Inhibitor Protein in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012;18:471-477.
356. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and Its Relationship to Loss of Apoptosis in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134.
357. Youssef NS, Hewedi IH, Raboh NM. Immunohistochemical Expression of Survivin in Breast Carcinoma: Relationship with Clinicopathological Parameters, Proliferation and Molecular Classification. *J Egypt Nat Cancer Inst* 2008;20:348-357.
358. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, et al. Survivin and Caspase-3 Expression in Breast Cancer: Correlation With Prognostic Parameters, Proliferation, Angiogenesis, and Outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16:113-120.
359. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 2001;34:207-212.
360. Gang LY, Yu F, Yao Q, et al. The role of survivin in diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer. *J Thorac Dis* 2010;2:100-110.
361. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, et al. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2008;14:5000-5005.
362. Jha K, Shukla M, Pandey M.. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surg Oncol* 2012;21:125-131.
363. Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. *Drug Discovery Today*. 2011;16:428-435.
364. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Publishing Group* 2008;8:61-70.
365. Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle* 2009;8:2708-2710.

366. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, et al. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 2006;312:1798-1802.
367. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Human pathol* 2005;36:250-261.
368. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, et al. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. *Clin Cancer Res* 2010;16:2391-2401.
369. Press MF, Sauter G, Buyse M, et al. Alteration of topoisomerase II- α gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2011;29:859-867.
370. O'Malley FP, Chia S, Tu D, et al. Topoisomerase II α and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Nat Cancer Inst* 2009;101:644-650.
371. Desmedt C, Di Leo A, de Azambuja E, et al. Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines. *J Clin Oncol* 2011;29:1578-1586.
372. Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, et al. Amplification and overexpression of topoisomerase II α predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1061-1067.
373. Romero A, Martin M, Cheang MC, et al. Assessment of Topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2011;178:1453-1460.
374. Stacey DW, Hitomi M, Chen G. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II α expression and drug toxicity. *Mol Cell Biol* 2000;20:9127-9137.
375. Fidler J, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977;197:893-895.
376. Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, et al. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:15901-15905.

377. Weigelt B, Hu Z, He X, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:9155-9158.
378. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4611-4619.
379. Bender RA, Erlander MG. Molecular classification of unknown primary cancer. *Semin Oncol* 2009;36:38-43.
380. De Snoo F, Bender R, Glas A, et al. Gene expression profiling: Decoding breast cancer. *Surgical Oncology* 2009;18:366-378.
381. Espenosa E. Gene profiling in breast cancer: Time to move forward. *Cancer Treat Rev* 2011;37:416-421.
382. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.
383. Arpino G. Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective. *Breast* 2013; 22:109-120.
384. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006;8:25.
385. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986;55:244-248.
386. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods* 1987;103:121-129.
387. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847.
388. Charpin C, Secq V, Giusiano S, et al. A signature predictive of disease outcome in breast carcinomas, identified by quantitative immunocytochemical assays. *Int J Cancer* 2009;124:2124-2134.

389. Giusiano S, Secq V, Carcopino X, et al. Immunohistochemical profiling of node negative breast carcinomas allows prediction of metastatic risk. *Int J Oncol* 2010;36: 889-898.
390. Charpin C, Tavassoli F, Secq V, et al. Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. *Int J Cancer* 2012;131:236-243.
391. Mohammadizadeh F, Ghasemibasir H, Rajabi P, et al. Correlation of E-cadherin expression and routine immunohistochemistry panel in breast invasive ductal carcinoma. *Cancer Biomark* 2009;5:1-8.
392. Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:158.
393. Youssef NS, Hewedi IH, Abd Raboh NM. Immunohistochemical expression of survivin in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. *J Egypt Natl Canc Inst* 2008;20:348-357.
394. El-Gendi SM, Mostafa MF, El-Gendi AM. Stromal caveolin-1 expression in breast carcinoma. Correlation with early tumor recurrence and clinical outcome. *Pathol Oncol Res* 2012;18:459-469.
395. Ma W, Dengy Y, Zhouy L. The Prognostic Value of Adhesion Molecule CD44v6 in Women with Primary Breast Carcinoma: A Clinicopathologic Study. *Clin Oncol* 2005;17:258-263.
396. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1474-1481.
397. Diallo R, Rody A, Jackisch C, et al. C-KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu. *Hum Pathol* 2006;37:205-211.
398. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, et al. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2010;23:251-259.

399. Freeman DH. Applied categorical data analysis. Marcel Dekker Inc; 1987
400. Hosmer David W., Lemeshow S. Applied Logistic Regression. Wiley-Interscience 2000; 95.
401. Cheang M, Chia SK, Voduc D. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Nat Cancer Inst 2009; 101:736-750.
402. Noorasmaliza MdPaiman N. Estrogen Receptor-Negative Breast Ductal Carcinoma: Clinicopathological Features and Mib-1 (Ki-67).Proliferative Index Association. PLoS One 2014;9:89172.
403. Segal CV, Dowsett M. Estrogen receptor mutations in breast cancer - new focus on an old target. Clin Cancer Res 2014;20:1724-1726.
404. Prabhu JS, Korlimarla A, DesaiK, et al. A Majority of Low (1-10%) ER Positive Breast Cancers Behave Like Hormone Receptor Negative Tumors. J Cancer. 2014;5:156-165.
405. Chen Ch, Yuan JP, We W, et al. Subtype classification for prediction of prognosis of breast cancer from a biomarker panel: correlations and indications. Int J Nanomedicine 2014;21:1039-1048.
406. Bae MS. Quantitative MRI morphology of invasive breast cancer: correlation with immunohistochemical biomarkers and subtypes. Acta Radiol 2014;20.
407. Hosoda M. Differential expression of progesterone receptor, FOXA1, GATA3, and p53 between pre- and postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2014;144:249-261.
408. Saini A, Hou J, Zhou W. RRHGE: A Novel Approach to Classify the Estrogen Receptor Based Breast Cancer Subtypes. Sci World J 2014;2014: 362141.

409. Kumar V, Abbas AK, Fausti N, et al. Patología estructural y funcional. 8th. Barcelona: Elsevier; 2010.
410. Yu GH, Lawton TJ, Pasha TL, et al. Intercellular adhesion molecule expression in ductal carcinoma of the breast: Correlation of immunohistochemical staining with cytologic smear pattern. *Diagn Cytopathol* 2000; 23: 73-76.
411. Gupta A, Deshpande CG, Badve S. Role of E-Cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer* 2003; 97: 2341-2347.
412. Gunji N, Oda T, Todoroki T, et al. Pancreatic carcinoma: correlation between E-cadherin and a-catenin expression status and liver metastasis. *Cancer* 1998; 82: 1649-1656.
413. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, et al. Characterization of extracellular matrix-degrading proteinase and its inhibitor in gynecologic cancer tissues with clinically different metastatic form. *Cancer* 1995; 76: 2565-2571.
414. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80:1943-1949.
415. Kanapathy Pillai SK. Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *Clin Pathol* 2012;12:18.